

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. F. Maier

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Auswirkungen von Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie
am unreifen Gehirn der Ratte:
Immunhistochemische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Carolin Sigrid Blüml aus Langen
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
30. Oktober 2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. R.F. Maier

1. Korreferent: Prof. Dr. E. Weihe

“We shall not cease from exploration
And the end of all our exploring
Will be to arrive where we started
And know the place for the first time.”
T.S. Eliot, Four Quartets

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Frühgeburtlichkeit	1
1.1.1	Epidemiologie der Frühgeburtlichkeit	1
1.1.2	Mortalität bei Frühgeburtlichkeit.....	1
1.1.3	Zusammenhang Morbidität und Gestationsalter.....	2
1.2	Intrauterine Sauerstoffversorgung	2
1.3	Perinatale Umstellungsvorgänge des Menschen	3
1.4	Sauerstoff in der Versorgung von Neu- und Frühgeborenen.....	3
1.5	Sauerstoffabhängige Erkrankungen beim Frühgeborenen.....	4
1.5.1	Darm - Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)	5
1.5.2	Lunge - Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)	6
1.5.3	Auge – Retinopathia praematurorum (ROP)	7
1.6	Periventrikuläre Leukomalazie (PVL)	8
1.6.1	Definition.....	8
1.6.2	Neuroanatomie und -physiologie im Zusammenhang mit PVL.....	9
1.6.3	Entwicklungszeitraum für PVL	10
1.6.4	PVL und Infantile Zerebralparese (ICP).....	10
1.6.5	PVL und Korrelate in der pathologischen Untersuchung.....	11
1.6.6	Pathogenese der PVL.....	13
1.7	Zusammenhang PVL und ROP	19
1.8	Das sich entwickelnde Gehirn im Tiermodell.....	20
1.9	Tiermodelle für PVL	21
1.9.1	Das Rice-Vannucci-Modell	21
1.9.2	Nachweis von MBP (Myelin-Basis-Protein) bei der neonatalen Ratte...	24
1.9.3	MBP-Expression im Rice-Vannucci-Modell	24
1.9.4	Schädigung der kontralateralen Seite im Rice-Vannucci-Modell.....	25
1.9.5	Genexpression im Rice-Vannucci-Modell.....	25
1.10	Einfluss des Geschlechtes auf zerebrale Schädigungen.....	27
1.11	Ziel der Arbeit	28
2	Methodik	29
2.1	Teilbereiche des Projektes	29
2.2	Tiere und Haltung	29

2.3	Versuchsaufbau und Interventionsgruppen	29
2.3.1	Intervention an postnatalem Tag 6 (P6)	30
2.3.2	Zeitliche Abfolge der verschiedenen Untersuchungen	31
2.4	Tierversuch	32
2.4.1	Pharmakologische Interventionen	32
2.4.2	Unilaterale Karotisligatur.....	36
2.4.3	Unilaterale Karotisligatur in Bildern.....	39
2.4.4	Hypoxie und Hyperoxie.....	40
2.4.5	Tiertötungen.....	42
2.5	Gehirnentnahme und –präparation.....	45
2.6	Gehirnkonservierung und –lagerung	46
2.7	Histologische Methoden	47
2.7.1	Herstellung von Schnitten.....	47
2.7.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	48
2.7.3	Myelin-Basis-Protein-Färbung (MBP-Färbung)	49
2.7.4	Mikroskopieren der HE-Färbung.....	51
2.7.5	Mikroskopieren der MBP-Färbung.....	53
2.7.6	MBP-Score	55
2.8	Molekularbiologische Methoden	57
2.8.1	Homogenisation des Gehirngewebes.....	57
2.8.2	RNA-Extraktion	57
2.8.3	RNA-Qualitätsnachweis.....	58
2.8.4	Reverse Transkription.....	60
2.8.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	61
2.8.6	Primer	63
2.8.7	Berechnung des fold change mittels $\Delta\Delta CT$ Methode	64
2.8.8	Geschlechtsbestimmung	65
2.9	Materialien (Tabellarische Auflistung).....	68
2.9.1	Verbrauchsmaterialien.....	68
2.9.2	Geräte	69
2.10	Statistik	71
2.10.1	Statische Auswertung des MBP-Scores	71
2.10.2	Statische Auswertung der Genexpressionsanalyse	74

3	Ergebnisse	77
3.1	Mortalität im Rice-Vannucci-Modell	77
3.1.1	Todesursachen im Rice-Vannucci-Modell	77
3.2	Histologie	78
3.2.1	Komplikation Infarkt im Rice-Vannucci-Modell	78
3.2.2	MBP-Score - Ergebnisse	79
3.3	Molekularbiologie	88
3.3.1	RNA – Qualität	88
3.3.2	Genexpressionsanalyse	89
3.3.3	Epo-R	91
3.3.4	HIF-1 α	93
3.3.5	NOS-2	94
3.3.6	TNF α	95
3.3.7	VEGF-A164	97
3.4	Einfluss des Geschlechts auf MBP-Score u. Genexpressionsanalyse	98
4	Diskussion	99
4.1	Mortalität im Rice-Vannucci-Modell	99
4.2	Komplikation Infarkt	100
4.2.1	Einfluss des Alters der Tiere auf die Infarktrate	100
4.2.2	Einfluss der Narkose auf die Infarktrate	101
4.2.3	Einfluss des zerebralen Blutfluss (CBF) auf die Infarktrate	102
4.2.4	Einfluss des Rattenstammes auf die Infarktrate	103
4.2.5	Einfluss der Erholungsphase und Hypoxie auf die Infarktrate	104
4.2.6	Einfluss der Körpertemperatur auf die Infarktrate	106
4.2.7	Fazit Komplikation Infarkt	107
4.3	Interpretation histologische Ergebnisse - MBP-Score	108
4.3.1	Schäden durch Ischämie + Hypoxie	108
4.3.2	Schäden durch Hyperoxie	108
4.3.3	Schäden durch Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie	109
4.3.4	Schädigung der kontralateralen Seite nach Ischämie + Hypoxie	109
4.4	Interpretation Genexpressionsanalyse	110
4.4.1	Epo-R	110
4.4.2	HIF-1 α	111

4.4.3	NOS-2.....	112
4.4.4	TNF α	112
4.4.5	VEGF-A164	113
4.4.6	Einfluss des Geschlechtes auf zerebrale Schädigung.....	114
4.5	Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit.....	115
4.6	Klinische Bezüge und Ausblick.....	116
	Zusammenfassung.....	119
	Summary	120
	Abkürzungsverzeichnis	121
	Abbildungsverzeichnis.....	125
	Tabellenverzeichnis.....	127
	Literaturverzeichnis	129
	Anhang	VI
	Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer.....	XVI
	Danksagung	XVII

1 Einleitung

1.1 Frühgeburtlichkeit

Physiologischerweise dauert die Schwangerschaft des Menschen 280 Tage. Es wird vom ersten Tag der letzten Menstruation gerechnet und wird in Schwangerschaftswochen (SSW) und Tagen gezählt. Als frühgeboren gilt ein Kind, wenn es mit einem Gestationsalter unter 259 Tagen bzw. 37+0 SSW geboren wird.

Neben einer Einteilung nach Gestationsalter können Frühgeborene nach Geburtsgewicht eingeteilt werden:

- Geburtsgewicht unter 2500 g: *low birth weight infants* (LBW)
- Geburtsgewicht unter 1500 g: *very low birth weight infants* (VLBW)
- Geburtsgewicht unter 1000 g: *extremely low birth weight infants* (ELBW)

1.1.1 Epidemiologie der Frühgeburtlichkeit

In Deutschland kamen 2015 728.496 Kinder zur Welt, davon 6,46 % im Gestationsalter zwischen 32 und 36 SSW, 0,78 % zwischen 28 und 31 SSW und 0,54 % unter 28 SSW (IQTIG, 2016). Im europäischen Vergleich hat Deutschland mit ca. 8 % eine höhere Frühgeburtlichkeitsrate als Skandinavien und das Baltikum, wo es 6,5 % sind (Euro-Peristat-Project, 2014). Das wird auch durch die Daten aus Hessen bestätigt. Die Region lag im Vergleich zu anderen europäischen Regionen mit einer Rate von 11,9 % im Jahre 2003 bei den Kindern zwischen 22+0 und 31+6 SSW bei den höchsten Frühgeburtlichkeitsraten in Europa (Field et al., 2009).

Frühgeburtlichkeit gilt als wichtigste Ursache für Morbidität und Mortalität im Kindesalter (Swamy et al., 2008).

1.1.2 Mortalität bei Frühgeburtlichkeit

Durch Verbesserungen in der intensivmedizinischen Versorgung konnte in den letzten 20 Jahren die Überlebensrate von Frühgeborenen mit einem Gestationsalter unter 32 SSW bzw. unter 1500 g Geburtsgewicht von 70 % auf etwa 90 % erhöht werden (Maier & Obladen, 2006). In den USA lag die Überlebensrate 2010 bei 6 % mit 22 SSW und bei 92 % mit 28 SSW (Stoll et al., 2010).

Die Frühgeburtlichkeit ist weiterhin zu über 75 % verantwortlich für die perinatale Mortalität (Berghella, 2010). Niedriges Gestationsalter oder geringes Geburtsgewicht sind vor allem mit der Mortalität assoziiert (The International Neonatal Network, 1993).

1.1.3 Zusammenhang Morbidität und Gestationsalter

Zur Frage, ob die Morbidität mit dem fallenden Gestationsalter und Geburtsgewicht steigt, gibt es widersprüchliche Literatur. In einer großen Übersichtsarbeit zeigte sich eine breite Streuung der Überlebensraten. Im Kleinkindalter litten 34 % der überlebenden Frühgeborenen mit 23 SSW an einer schweren Behinderung, bei den Frühgeborenen mit 24 SSW lag die Rate zwischen 22 und 45 % und bei den Frühgeborenen mit 25 SSW bei 12 bis 35 %. Verglichen mit den Kindern, die vor 1990 geboren wurden, blieb der Prozentsatz der Schwerbehinderungen gleich (Hack & Fanaroff, 2000).

Andere Daten zeigen, dass bei Kinder mit einem Gestationsalter unter 28 SSW kein signifikanter Zusammenhang zwischen neonataler Morbidität und Gestationsalter vorhanden war (Chan et al., 2001; Costeloe et al., 2000). Dies bestätigen auch Daten aus den USA (Hoekstra et al., 2004).

Eine norwegische Arbeit belegt eine Reduktion der Rate der Frühgeborenenretinopathie (ROP) mit steigendem Gestationsalter (Markestad et al., 2005). Daten aus Deutschland demonstrieren bei extrem unreifen Frühgeborenen keine Abhängigkeit der Morbidität vom Gestationsalter (Rapp et al., 2005).

Andere Studien zeigen, dass die Abnahme der Morbidität mit steigendem Gestationsalter zusammenhängt (Cust et al., 2003; Doyle, 2001). Erklärbar sind die Unterschiede möglicherweise durch die zentralen und dezentralen Versorgungsstrukturen in verschiedenen Ländern (Rapp et al., 2005). Morbidität und auch Mortalität können durch die Versorgung von Frühgeborenen an spezialisierten Zentren gesenkt werden (Binder et al., 2011; Warner et al., 2004).

1.2 Intrauterine Sauerstoffversorgung

Der Sauerstoffpartialdruck (PO_2) ist intrauterin verglichen mit dem des postnatalen Lebens niedriger. In der Nabelarterie beträgt der PO_2 ca. 34 mmHg (± 4 mmHg), in der Nabelvene ca. 55 mmHg (± 7 mmHg) (Soothill et al., 1986). Beim gesunden Erwachsenen im Vergleich liegt der mittlere arterielle PO_2 bei 95 bis 100 mmHg (Pelken & Maier, 2008). Intrauterin beträgt die Sauerstoffsättigung

ca. 50 bis 60 % und steigt postnatal innerhalb von 10 Minuten auf über 90 % an (Dawson et al., 2010; Kuhnert et al., 1998).

Die adäquate Versorgung des fetalen Gewebes mit Sauerstoff funktioniert trotz des niedrigen PO_2 . Sie wird durch verschiedene Faktoren bedingt, u.a. ist die Affinität des fetalen Hämoglobins für Sauerstoff höher und das Kind hat intrauterin einen niedrigeren Sauerstoffverbrauch, da unter anderem die Thermoregulation, Ernährung und Oxygenierung über die Mutter erfolgt.

Durch die Besonderheiten des fetalen Kreislaufes kann der Organismus trotz des niedrigen PO_2 suffizient versorgt werden. Das Gehirn erhält über das *Foramen ovale*, die linke Herzkammer und die *Aorta ascendens* aus der Nabelvene sauerstoffreiches Blut. Sauerstoff perfundiert direkt zur Versorgung der Leber aus der Nabelvene (Jorch & Hübler, 2010).

1.3 Perinatale Umstellungsvorgänge des Menschen

Nach dem Abnabeln und Entfernen des Fruchtwassers müssen die Atemwege ihre eigentliche Arbeit, den Gastransport und -austausch übernehmen. Durch die Umstellung der plazentaren auf die pulmonale Oxygenierung im Rahmen der Geburt kommt es plötzlich zu einem deutlichen Anstieg des Sauerstoffangebotes. Bei Frühgeborenen tritt dieses Ereignis zu einem sehr frühen Zeitpunkt ein, so dass sie gegenüber unphysiologisch hohen Konzentrationen von Sauerstoff exponiert werden, die als relative Hyperoxie bezeichnet werden. Durch ärztliche Maßnahmen wie Sauerstofftherapie und Beatmung kann diese noch verstärkt werden (Castillo et al., 2008; Pelken & Maier, 2008).

1.4 Sauerstoff in der Versorgung von Neu- und Frühgeborenen

Zur Reanimation von Neugeborenen wurde lange Zeit 100 % Sauerstoff verwendet. Die Erforschung der sauerstoffinduzierten Erkrankungen am Gehirn, Auge, der Lunge und dem Darm haben diese Praxis verändert. Die Empfehlung, von Asphyxie betroffene Neugeborene mit 100 % Sauerstoff zu behandeln, wurde revidiert (Davis et al., 2004; Niermeyer et al., 2000).

Für Reifgeborene und Fast-Reifgeborene sollte bei Beatmung initial Raumluft verwendet werden, da die Kinder dadurch einen signifikanten Vorteil haben im Vergleich zur Beatmung mit 100 % Sauerstoff. Höhere Sauerstoffkonzentrationen sollten als Reserve dienen, falls die Maßnahme erfolglos bleibt (Davis et

al., 2004; Wyllie et al., 2015). Bei gesunden Reifgeborenen dauert es postnatal ca. 10 Minuten bis die Sauerstoffsättigung auf 95 % ansteigt (Dawson et al., 2010; Toth et al., 2002).

In einer Metaanalyse wurde gezeigt, dass die Reanimation von Frühgeborenen unter 35 SSW mit hohen Sauerstoffgaben (Sauerstoffkonzentration > 65 %) im Vergleich zu Sauerstoffkonzentrationen von 21 bis 30 % die Überlebensrate nicht erhöht (Armanian & Badiee, 2012; Kapadia et al., 2013; Lundstrom et al., 1995; Rabi et al., 2011; Rook et al., 2014; Vento et al., 2009; C. L. Wang et al., 2008). Hohe Sauerstoffkonzentrationen konnten das Auftreten der typischen Erkrankungen des Frühgeborenen wie Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), Intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) und ROP nicht vermindern (Kapadia et al., 2013; Rabi et al., 2011; Rook et al., 2014; Vento et al., 2009; C. L. Wang et al., 2008).

Langfristig erhöhten hochdosierte Sauerstoffgaben bei Frühgeborenen mit 24 bis 27 SSW die Überlebenschancen, jedoch nahm die Rate an neurologischen Defiziten zu (Vaucher et al., 2012). Unter hochdosierter Sauerstofftherapie stieg die Rate der schweren Retinopathien von 8,6 auf 17,9 % (Carlo et al., 2010).

Daraus resultiert, dass bei Frühgeborenen unter 35 SSW mit Sauerstoffkonzentrationen von 21 bis 30% begonnen werden sollte (Perlman et al., 2015; Saugstad et al., 2014; Wyllie et al., 2015; Wyllie et al., 2010). Die Sauerstoffgaben sollten titriert appliziert werden und sich an der präduktalen Sauerstoffsättigung orientieren. Die Werte sollten ungefähr der 25. Perzentile der reifgeborenen Kinder direkt nach der Geburt entsprechen (Dawson et al., 2010; Mariani et al., 2007; Wyckoff et al., 2015).

1.5 Sauerstoffabhängige Erkrankungen beim Frühgeborenen

Die ungewöhnlich hohe Sauerstoffverfügbarkeit im Rahmen der perinatalen Umstellungsvorgänge bei Frühgeborenen verändern die Genexpression und führen an verschiedenen Organen zu pathologischen Vorgängen und Erkrankungen (Pelken & Maier, 2008).

Die Abbildung 1 zeigt die Wirkungen und Komplikationen von Sauerstoff bei Frühgeborenen und die damit verbundenen Erkrankungen:

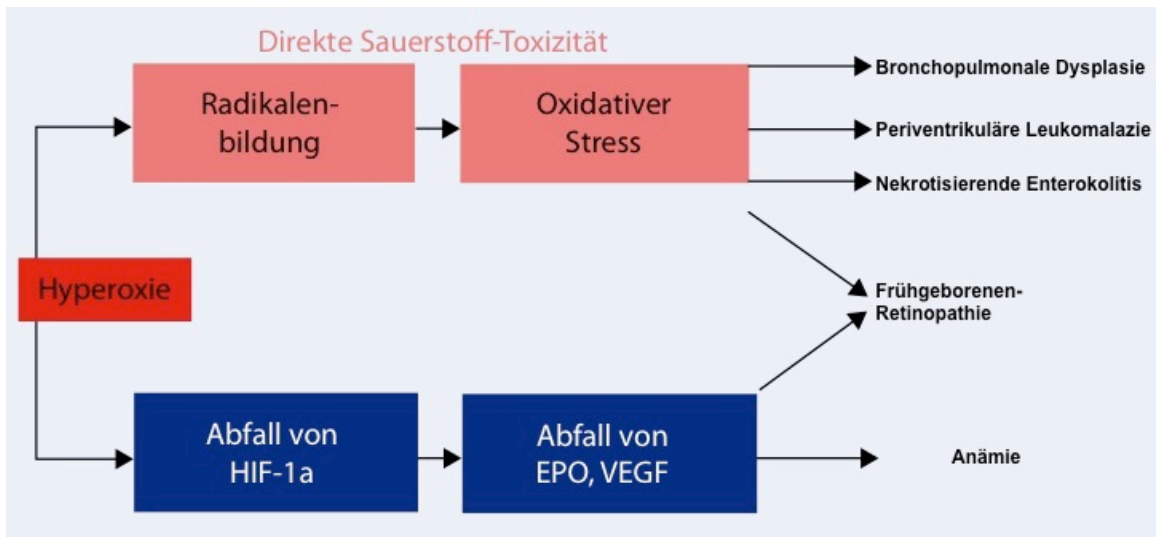


Abbildung 1: Wirkung und Komplikationen von Sauerstoff bei Frühgeborenen

Übernommen nach Pelken u. Maier (Pelken & Maier, 2008).

HIF-1a: *Hypoxia-inducible factor 1α*

EPO: Erythropoetin

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

1.5.1 Darm - Nekrotisierende Enterokolitis (NEC)

Die NEC ist eine akute schwerwiegende Entzündung, die zu einer perforierenden Nekrose der Darmwand führt. Dies kann diskontinuierlich sein mit entzündungsfreien Segmenten. Ebenso ist ein kompletter Befall vom Magen bis zum Rektum möglich.

Zu 90 % sind die Betroffenen Frühgeborene, vor allem Kinder unter 28 SSW. Bei NEC wurde eine Letalität von 25 bis 30 % beschrieben. Sie trat mit einer Häufigkeit von 2 bis 5 % bei den VLBW-Kindern auf (Tudehope, 2005).

Ätiologisch spielten die Faktoren enterale Ernährung, Besiedlung mit Bakterien und Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren die größte Rolle (Miller et al., 1990; Stoll, 1994). Außerdem scheint die unreife und verminderte Durchblutungsregulation und die daraus resultierende Hypoxie und Ischämie eine Rolle in der Entstehung der NEC zu spielen. Die Umverteilung des Blutes im Rahmen von Apnoen/ Bradykardien in die lebenswichtigen Organe wie Herz und Gehirn begünstigt möglicherweise die hypoxisch-ischämische Schädigung des Darmes (Di Lorenzo et al., 1995; Di Lorenzo & Krantis, 2001; Neu, 2005; Nowicki & Nankervis, 1994).

1.5.2 Lunge - Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)

Die BPD ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Lunge mit charakteristischen radiologischen Befunden. Die davon betroffenen Frühgeborenen benötigen über ihren 28. Lebenstag hinaus zusätzliche Sauerstoff-Gaben und/ oder künstliche Beatmung (Shennan et al., 1988). Eine Einteilung in 3 verschiedene Grade erfolgt altersabhängig (Jobe & Bancalari, 2001).

Bereits der Erstbeschreiber Northway wies daraufhin, dass die Entstehung der BPD durch die Faktoren Barotrauma und Sauerstofftoxizität im Rahmen mechanischer Beatmung bedingt sei (Northway et al., 1967). In Folgestudien konnte gezeigt werden, dass das Atemzugvolumen und nicht der Druck zur Schädigung führt (Bjorklund et al., 1997). Sauerstoff gilt bis in die heutige Zeit als Hauptfaktor in der Entstehung einer BPD (Day & Ryan, 2017).

Zur suffizienten Oxygenierung bei schwerem Atemnotsyndrom wurden in der Zeit vor Einführung des Surfactant hohe Sauerstoffkonzentrationen verwendet, die durch die Kombination aus Sauerstoffradikalen und unreifen antioxidativen Möglichkeiten der Frühgeborenen zur Schädigung der Lunge führten (Jorch & Hübler, 2010). Inflammation in der Lunge ist nach Einführung des Surfactant zum wichtigsten Faktor in der Entstehung einer BPD geworden (Watterberg et al., 1996).

Die embryonale und fetale Lungenentwicklung geht durch verschiedene Phasen. Mit 24 bis 26 SSW findet die sakkuläre Phase der Entwicklung statt, dabei bilden sich an den terminalen Enden des Lungenbaums glattwandige Alveolarsäckchen (Sacculi) aus den Alveolargängen. Durch die Stimulation von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wird die Weiterentwicklung der Kapillaren und damit der Alveolen gefördert (Coalson, 2003).

Die Regulation der Wachstumsfaktoren (u.a. VEGF *Vascular endothelial growth factor*) erfolgt sauerstoffabhängig über HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor 1 α*) (Compennolle et al., 2002). Intrauterin ist die HIF-Expression durch die niedrigen Sauerstoffkonzentrationen hoch. Postnatal sind die Frühgeborenen mit einer relativen Hyperoxie konfrontiert, die zu einer Reduktion der HIF-Expression führt und daraus folgend zu niedrigeren Wachstumshormonkonzentrationen (Lassus et al., 1999; Lassus et al., 2001).

1.5.3 Auge – Retinopathia praematurorum (ROP)

Bei der ROP handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte vasoproliferative Erkrankung der Retina. Physiologischerweise ist die Vaskularisation der Retina intrauterin mit 36 SSW abgeschlossen. Der typische Zeitraum für den Beginn der ROP liegt zwischen 32 und 36 SSW. Das Auftreten einer ROP ist abhängig vom Geburtsgewicht bzw. der Unreife, die Inzidenz wird mit 27 bis 40 % angegeben (Jandeck et al., 2005).

Die relative Hyperoxie, der Frühgeborene ausgesetzt sind im Vergleich zu intrauterinen Verhältnissen, führt in der Frühphase der ROP zu einer Hemmung der VEGF-Bildung und somit zu einer Unterbrechung der Vaskularisation. In der zweiten Phase kommt es zu einer überschießenden und unkoordinierten Vaskularisation durch relative Hypoxie, dies wird durch erhöhtes VEGF hervorgerufen (Hartnett & Penn, 2012)

Die Sauerstoffkonzentration, die Dauer der Sauerstoffexposition, die Dauer von transkutan gemessener Sauerstoffspannung über 80 mmHg und der Wechsel von Hypoxie und Hyperoxie im Rahmen der für Frühgeborene typischen Apnoe-Anfälle sind wichtige Faktoren in der Entstehung der ROP, die entscheidende Rolle spielt allerdings das Gestationsalter (Cunningham et al., 1995; Flynn et al., 1992; York et al., 2004). Weitere wichtige Risikofaktoren sind Anämie und die daraus resultierende Blut-Transfusionen, sowie die Hyperkapnie, die zur Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und Weitstellung der Retinargefäße führt (Maier & Obladen, 2011; Pelken & Maier, 2008).

Zur Klassifikation der ROP wird der Fundus nach Uhrzeiten und in 3 konzentrische Zonen eingeteilt (Zone I zentral, Zone III peripher). Häufig treten die Fundusveränderungen asymmetrisch auf. Die Prognose ist umso schlechter, je weiter zentral der arteriovenöse Shunt bzw. die Wallbildung auftreten. Durch das Zerreißen neugebildeter Gefäße kommt es zu Retinablutungen.

Die Bezeichnung des Stadiums wird mit + ergänzt, wenn zusätzlich eine Erweiterung der Venen und Schlängelung der Arteriolen besteht. *Threshold disease* beschreibt eine ROP im Stadium III+, die sich über 5 oder mehr zusammenhängende bzw. 8 unzusammenhängende Stundensegmente erstreckt (Maier & Obladen, 2011). Die Stadien der ROP werden wie folgt eingeteilt (2005):

Tabelle 1: Klassifikation der ROP

Stadium	Proliferationsphase
I	Demarkationslinie (dünne, nicht erhabene, weiße Linie am Übergang zwischen vaskularisierter und avaskulärer Retina)
II	Leiste (erhabene rosige Demarkationslinie)
III	Wall mit extraretinaler fibrovaskulärer Proliferation
IVa	Partielle Netzhautablösung ohne Makulabeteiligung
IVb	Partielle Netzhautablösung mit Makulabeteiligung
V	Totale Netzhautablösung

1.6 Periventrikuläre Leukomalazie (PVL)

1.6.1 Definition

Bei Gehirnschädigungen des Neugeborenen muss unterschieden werden zwischen Früh- und Reifgeborenen. Bei Reifgeborenen treten perinatale Hirnschädigungen häufig als Folge einer Asphyxie oder einer traumatischen Geburt auf (Jorch & Hübler, 2010). Bei Frühgeborenen werden unterschieden:

- PVL
- Hirnblutung des Frühgeborenen (subependymale Blutung/ IVH)

Bei PVL kommt zu einer Schädigung der periventrikulären weißen Substanz, die als grundlegende Ursache der chronischen neurologischen Schädigung des Frühgeborenen anzusehen ist (Volpe, 1997, 1998a, 2001). Sie ist primär eine Erkrankung der tiefer gelegenen weißen Substanz nahe der Ventrikel. Es kommt zur Störung der Differenzierung der Oligodendrozyten (OL), was zu motorischen und vor allem kognitiven Defiziten in der neurologischen Entwicklung des betroffenen Kindes führt (Haynes et al., 2003; Volpe, 2008).

Ungefähr 10 % der Extremfrühgeborenen leiden unter PVL und entwickeln im Verlauf motorische Defizite, die charakteristisch für eine Infantile Zerebralparese (ICP) sind (Oskoui et al., 2013). Weiteres siehe 1.6.4 PVL und Infantile Zerebralparese (ICP).

1.6.2 Neuroanatomie und -physiologie im Zusammenhang mit PVL

Neurone und Oligodendrozyten (OL)

Die strukturelle und funktionelle Einheit des Nervensystems ist das Neuron, das aus einem Zellkörper (*Perikaryon*) und seinen Fortsätzen (Axone) besteht.

Damit Nervenzellen ihre Funktion ausüben können, sind sie auf die Unterstützung der Gliazellen angewiesen. Diese sind im Gegensatz zu Nervenzellen in der Lage zu proliferieren und kommen in zehnfach höherer Zahl als Neurone vor. Gliazellen haben eine Stütz-, Hüll- und Schutzfunktion, sorgen für das Kalium- und Wasserstoff-Gleichgewicht und recyceln Transmitter. Sie bilden aber auch Narben, kleiden die Ventrikel aus, dienen als Baustoff für Grenzmembranen und nehmen an Abwehrreaktionen des ZNS (zentrales Nervensystem) teil. Bei Geburt um 24 SSW ist die neuronale Migration beendet, Glia-Zell-Reifung und -auswachsen, sowie Ausbildung von Verbindung untereinander sind weiterhin im Gange (Stiles & Jernigan, 2010; Volpe, 2001).

Im Gehirn bilden die OL die sogenannte Markscheide aus, die die Axone der Nervenzellen umhüllen. Zahlreiche Autoren haben die Entwicklung der OL beschrieben (Back et al., 2001; Baumann & Pham-Dinh, 2001; Hardy & Reynolds, 1991; Pfeiffer et al., 1993):

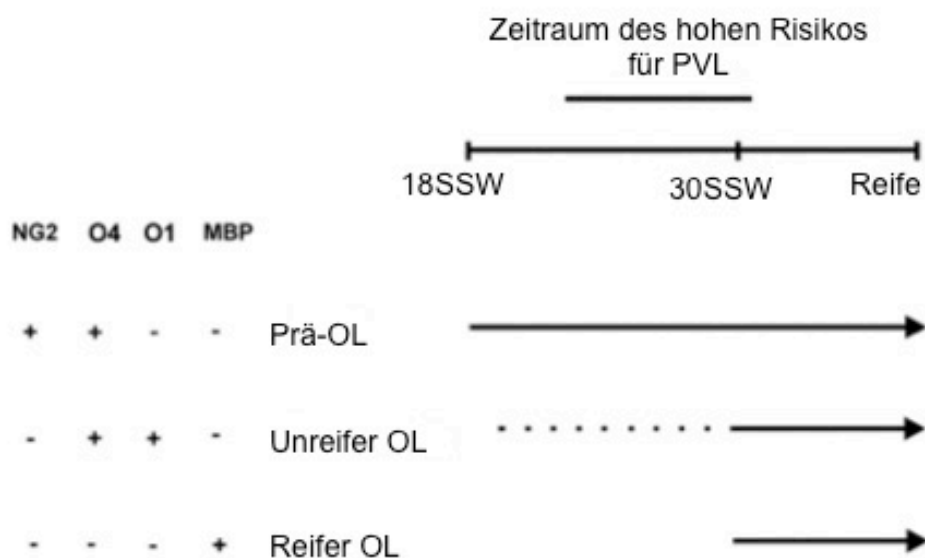


Abbildung 2: Übersicht über OL-Stadien, Antikörper-Markierungen und PVL-Risiko

Modifiziert nach Back (Back et al., 2001)

NG2: neural-gliales-Antigen-2-Proteoglykan

O1: OL-Marker-O1-Antikörper

O4: OL-Marker-O4-Antikörper

Im menschlichen Gehirn mit einem Gestationsalter zwischen 18 und 41 SSW liegen 3 verschiedene Formen von OL vor: Prä-Oligodendrozyten (Prä-OL), unreife OL und reife OL. Sie werden durch verschiedene Proteine charakterisiert (siehe Abbildung 2). Zwischen 18 und 27 SSW liegen ca. 10 % unreife OL und 90 % Prä-OL vor. Mit 30 SSW steigen die unreifen OL in der weißen Substanz auf 30 % an und treffen damit mit dem Zeitpunkt des lokalisierten Auftretens von Myelin-Basis-Protein (MBP) in der weißen Substanz zusammen.

OL und MBP (Myelin-Basis-Protein)

MBP macht etwa 40% der Myelinscheide des Axons aus und dient somit der Weiterleitung von Informationen im ZNS.

MBP kann zwischen 18 und 27 SSW nicht identifiziert werden, aber mit ca. 30 SSW wird es vor allem in der periventrikulären Region und der Sehstrahlung nachgewiesen. Mit dem Erreichen von 40 SSW kann eine größere Menge MBP periventrikulär und auch in der oberflächlichen weißen Substanz gezeigt werden (Back et al., 2001).

1.6.3 Entwicklungszeitraum für PVL

Der Zeitraum für die Entwicklung einer PVL (beim Menschen) ist klar zwischen 23 und 32 SSW definiert (Back & Volpe, 1997). Zwischen 24 und 32 SSW wird die periventrikuläre Region vor allem von Prä-OL bestimmt. Lokalisation und Zeitraum gelten als Prädilektionsfaktoren der PVL, die sich durch eine chronische Myelinisierungsstörung auszeichnet. Die Myelinisierung beginnt bei ca. 30 SSW in der periventrikulären Substanz und liegt somit jenseits der Hochrisikophase für PVL. Die späten Prä-OL scheinen das Hauptziel der ischämisch-hypoxischen Schädigung im Rahmen der PVL zu sein (Back et al., 2001).

Mit der Reifung der weißen Substanz rund um 32 SSW nimmt auch die Inzidenz für PVL ab (Back et al., 2001). Von PVL sind vor allem Frühgeborenen betroffen, da die vulnerable Phase des Gehirns gegenüber Sauerstoff mit 44 SSW endet (Kinney et al., 2005).

1.6.4 PVL und Infantile Zerebralparese (ICP)

Von den ca. 85 % VLBW-Kindern, die Ende des 20. Jahrhunderts in den USA überlebten, leiden ca. 5 bis 15 % unter spastischen Lähmungen, die auch als Infantile Zerebralparese bezeichnet wird (Volpe, 1998b). ICP beschreibt das klinische Erscheinungsbild neuraler Bewegungsstörungen beim Reif- und Früh-

geborenen und somit auch die motorischen Folgen der PVL (Jorch & Hübler, 2010).

Auch bei der ICP muss zwischen Reif- und Frühgeborenen unterschieden werden, bei den Reifgeborenen sind hypoxisch-ischämische Ereignisse im Rahmen von Asphyxien und neonatalem Apoplex Ursache der ICP. Für das Frühgeborene spielt die PVL, verursacht durch Hypomyelinisierung, die größte Rolle (Silbereis et al., 2010). Die Inzidenz der PVL wird mit 3 bis 6 % für VLBW-Kinder angegeben (Shankaran et al., 2005).

25 bis 50 % der überlebenden VLBW-Kindern, die Ende des 20. Jahrhunderts in den USA zur Welt gekommen waren, haben kognitive Einschränkungen und Lernschwierigkeiten. Das neuropathologische Korrelat zu diesen neurologischen Auffälligkeiten betrifft hauptsächlich die weiße Substanz in Form des periventrikulären Infarktes und der PVL (Volpe, 1998b). Im Laufe des zweiten Lebensjahrs entwickelt sich die spastische ICP als klinisches Korrelat zur PVL. Die Beine sind häufiger betroffen als die Arme, da die langen Bahnen näher am Seitenventrikel verlaufen als die kurzen, welche für die Arme zuständig sind (Imamura et al., 2013; Ledebt et al., 2008). Die teilweise auch vorkommenden intellektuellen Defizite werden darüber erklärt, dass es im Rahmen der PVL konsekutiv zu einer gestörten kortikalen Entwicklung kommt und somit einer Mitbeteiligung der grauen Substanz (Inder et al., 1999).

PVL gilt als aussagekräftigster prognostischer Marker für die Entwicklung von ICP und mentaler Entwicklungsverzögerung bei Kindern unter 1000 g (Adams-Chapman et al., 2008; Kuban et al., 2009; Marret et al., 2013; Sherlock et al., 2005; Vohr et al., 2005).

1.6.5 PVL und Korrelate in der pathologischen Untersuchung

PVL zeigt sich klinisch in 3 verschiedenen Formen:

- zystische PVL
- nicht-zystische PVL
- nicht-zystische PVL mit diffuser Astrogliose

Die zystische PVL ist die schwerste Form und ist charakterisiert durch fokale Nekrosen, die makroskopisch sichtbar sind und sich in multiple Zysten umwandeln.

Bei der nicht-zystischen Form sind die Nekrosen mikroskopisch und entwickeln sich zu Glia-Narben. Auch bei dieser Form sind die neurologischen Defizite schwerwiegender als bei der dritten Form, bei der die Veränderungen in der weißen Substanz ohne fokale Nekrosen aber mit diffuser Astrogliose einhergehen (Khwaja & Volpe, 2008).

Die inzwischen verfeinerte Bildung per Magnetresonanztomografie (MRT) hat gezeigt, dass bei den VLBW-Kindern die zystische Form der PVL mit 4 % auftritt und die nicht-zystische Form mit 15 % (Inder et al., 2003). Bei dieser Form sieht man eine diffuse Schädigung der weißen Substanz und eine Reduktion der grauen Substanz, die häufig mit kognitiven Einschränkungen und Verhaltensauffälligkeiten assoziiert sind (Doyle & Anderson, 2010; Monson et al., 2016; Thompson et al., 2008; Woodward et al., 2006).

Bei der nicht-zystischen PVL gibt es im Gegensatz zur zystischen Form keinen klar definierten zeitlichen Ablauf in der Entstehung der Schädigungen (Leviton & Gilles, 1984). In anderer Literatur wird sie auch als Enzephalopathie des Frühgeborenen bezeichnet. Als Hauptursachen werden Ischämie und Hypoxie kombiniert mit der eingeschränkten vaskulären Autoregulation (des Frühgeborenen) und Infektionen bei Mutter und/ oder Fetus gesehen (Kinney et al., 2004; Leviton & Dammann, 2004; Menke et al., 1997; Volpe, 1998a).

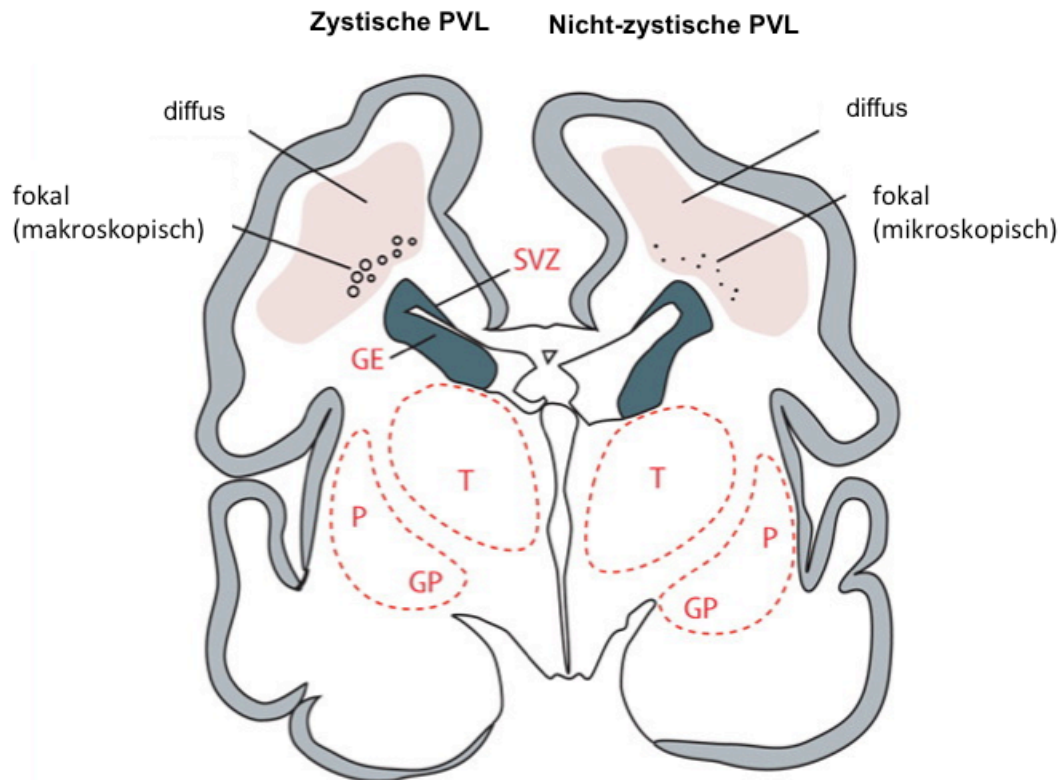


Abbildung 3: Schema zystische und nicht-zystische PVL

Modifiziert nach Volpe (Volpe, 2009)

GE: Ventrale germinale Matrix

GP: *Globus pallidus*

P: *Putamen*

SVZ: dorsale zerebrale subventrikuläre Zone

T: Thalamus

Durch moderne immunhistochemische Methoden konnten folgende Merkmale der PVL dokumentiert werden:

- Beschränkung auf die weiße Substanz, vor allem tieferer – kortexferner Regionen
- Bevorzugte Aktivierung von Mikroglia in der weißen Substanz
- Lipidperoxidation und Nitrierung von Proteinen in Prä-OL
- Vor allem Untergang von Prä-OL

Der Tod der OL scheint durch ROS (*reactive oxygen species*) und RNS (*reactive nitrogen species*) im Rahmen von Lipidperoxidation und Nitrierung von Proteinen verursacht zu sein (Haynes et al., 2003).

1.6.6 Pathogenese der PVL

PVL wird als ischämischer Schaden angesehen. Die Erhöhung freier Radikale ist ein häufig beschriebener Folgeschaden bei Ischämie und Reperfusion. In

vielen Studien mit fetalen und neonatalen Tieren konnte indirekt und direkt bewiesen werden, dass nach Ischämie und Reperfusion freie Sauerstoffradikale vermehrt anfallen. Einerseits konnte der erhöhte Anfall gezeigt werden, aber auch die Minderung der Schädigung des Gehirns durch den Einsatz von Radikalfängern und Inhibitoren (Volpe, 2001).

Ischämie

Die Ausbildung des periventrikulären Gefäßsystem findet vor allem in den letzten 16 Wochen der Schwangerschaft statt (Ballabh et al., 2004). Die weiße Substanz des Gehirns wird durch die langen und kurzen penetrierenden Arterien versorgt, die aus den *Aa. cerebri mediae* hervorgehen.

Die Läsionen bei fokaler PVL (zystische Form) entstehen in den periventrikulären arteriellen Endzonen der langen Gefäße, da diese Region beim Frühgeborenen durch verminderten zerebralen Blutfluss (CBF) besonders gefährdet für Ischämien ist.

Im letzten Trimester der Schwangerschaft nimmt die Anzahl der kurzen, die weiße Substanz penetrierenden Arterien zu, außerdem auch die Anzahl der Anastomosen mit den großen Arterien. Durch diesen Entwicklungsschritt werden die kritischen End- und Grenzzonen der arteriellen Gefäßversorgung weniger (Khwaja & Volpe, 2008). In den Grenzzonen zwischen den großen, penetrierenden Arterien und den Endzonen der kurzen, penetrierenden Arterien entsteht die diffuse PVL, da die Entwicklung der kurzen, penetrierenden Arterien wie auch die des Kortex erst nach dem errechneten Geburtstermin abgeschlossen ist (Volpe, 2001). Bei Frühgeborenen kann bereits eine geringgradige Ischämie zu fokalen nekrotischen Läsionen führen (Takashima et al., 1982). An neonatalen Schweinen, Lämmern, aber auch an Ratten stellte sich heraus, dass vor allem die unreife weiße Substanz vulnerabel für hypoxisch-ischämische Ereignisse ist (Jelinski et al., 1999; Reddy et al., 1998; Uehara et al., 1999; Yue et al., 1997).

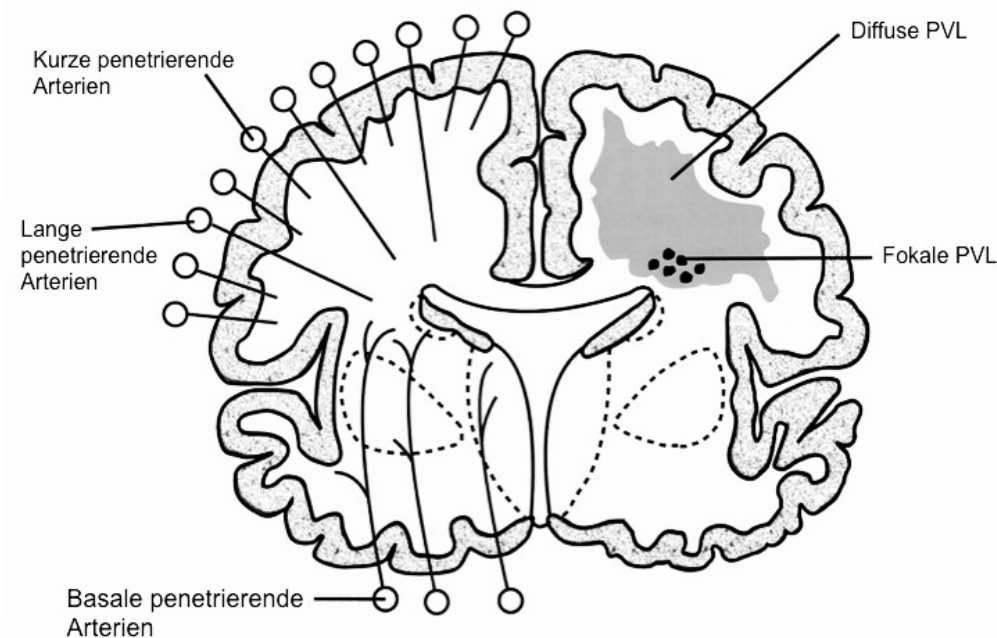


Abbildung 4: Schematische Darstellung zystische und nicht-zystische PVL

Koronarer Gehirnschnitt mit schematischer Darstellung zystische und nicht-zystische PVL modifiziert nach Volpe (Volpe, 2001)

Bei Erwachsenen beträgt der CBF ca. 50 ml/ 100 g/ Minute, bei einem CBF unter 10 ml/ 100 g/ Minute entsteht bei ihnen ein Infarkt. Beim Neugeborenen und Frühgeborenen kann ein CBF von 5 ml/ 100 g/ Minute noch mit einer normalen neurologischen Entwicklung des Kindes einhergehen (Altman et al., 1988).

Das menschliche Gehirn wird durch einen Autoregulationsmechanismus trotz Blutdruckschwankungen gleichmäßig mit Blut versorgt, indem der CBF relativ konstant gehalten wird (zerebrale Autoregulation). Bei Frühgeborenen kann dieser Mechanismus noch insuffizient sein, da sie aufgrund ihrer Unreife noch nicht über eine Muskelschicht in den die weiße Substanz penetrierenden Arteriole verfügen und so die intrinsische Vasoregulation gestört ist (Altman et al., 1988; Borch & Greisen, 1998; Khwaja & Volpe, 2008; Kuban & Gilles, 1985).

Soul et al. beschreiben, dass, wenn die Kapazitäten der zerebralen Autoregulation überschritten werden oder durch Krankheiten, Läsionen oder den Einsatz von vasoaktiven Medikamenten gestört sind, es zur sogenannten druckpassiven Zerebralperfusion (*pressure-passive cerebral circulation*) kommt.

Druckpassive Zerebralperfusion ist signifikant assoziiert mit niedrigem Gestationsalter und Geburtsgewicht, aber auch mit systemischer Hypotension und maternalen hämodynamischen Faktoren. Die systemische Hypotension und die Episoden von druckpassiver Zerebralperfusion korrelieren bei vielen Kindern,

befinden sich aber nicht in einer konstanten Beziehung. Somit reicht das Einhalten bestimmter Ziel-Blutdrücke nicht alleinig aus als Prävention von zerebraler Minderdurchblutung. Weitere noch nicht bekannte Faktoren scheinen eine wichtige Rolle zu spielen (Soul et al., 2007).

Beatmung und Hypokapnie

Da bei Frühgeborenen oft eine Beatmungstherapie notwendig ist, beobachtet man Schwankungen der Blutgase. Hypokapnie gilt als wichtiger Risikofaktor für PVL (Giannakopoulou et al., 2004; Murase & Ishida, 2005; Resch et al., 2004; Resch et al., 2000; Shankaran et al., 2006; Wiswell et al., 1996). Auch die Beatmung selbst gilt als Risikofaktor für PVL (Collins et al., 2001).

Inflammation

Chorioamnionitis spielt in der Entstehung von PVL eine wichtige Rolle (Dammann & Leviton, 1998; Grether et al., 1996; Leviton et al., 1999; Wu, 2002). Das Risiko für Frühgeborene an einer PVL zu erkranken ist achtfach erhöht, wenn bei ihnen aufgrund von klinischen Symptomen und einem positiven Kulturnachweis eine Infektion diagnostiziert wird (Glass et al., 2008).

Im Tiermodell schädigen Interleukine (IL) wie IL1 β , IL6 und IL9 sowie TNF α , die periventrikuläre weiße Substanz (Dommergues et al., 2000). Diese Zytokine können die Blut-Hirn-Schranke verändern und sie auch überwinden, da sie noch durchlässiger ist als bei älteren Kindern und Erwachsenen (Banks et al., 1994; Risau & Wolburg, 1990; Saija et al., 1995),

Eine Infektion über die Mukosa des Respirationstraktes kann z. B. eine proinflammatorische Zytokin-Produktion im Gehirn induzieren (Loscher et al., 2000). Yoon et al. zeigten, dass erhöhte IL-6-Werte im Nabelschnurblut ein Prädiktor für die Entstehung einer PVL sind (Yoon et al., 1996). Auch die T-Lymphozyten, IL1 β und IL10 im venösen Nabelschnurblut sind bei fetaler Infektion erhöht und können somit als Vorhersage-Faktor für zerebrale Läsionen gesehen werden. Ein erhöhtes maternales C-reaktives Protein kann als Prädiktor für Abnormitäten in der zerebralen MRT genutzt werden (Duggan et al., 2001).

Die Zytokine, vor allem IL1 β und TNF α , können auch, ohne dass eine Infektion vorliegt, bei dem alleinigen Vorkommen von Ischämien im Gehirn erhöht sein (Rothwell & Relton, 1993). Bei Khadim et al. findet sich die stärkste Erhöhung von IL1 β und TNF α in der PVL-Gruppe mit Infektion, gefolgt von der PVL-Gruppe ohne Infektion. Auch bei milder Proliferation von Mikroglia-Zellen finden

sich noch erhöhte Werte, jedoch deutlich niedriger als in den PVL-Gruppen (Kadhim et al., 2001).

Zusammenspiel Ischämie und Inflammation

Die Interaktion zwischen Ischämie und Inflammation scheint komplex zu sein. Es konnte gezeigt werden, bei Frühgeborenen unter 32 SSW die Chorioamnionitis assoziiert ist mit einer erhöhten Herzfrequenz und einem erniedrigten Blutdruck (Yanowitz et al., 2002). Bei Vorliegen einer Entzündung der Nabelschnur und der fetalen Plazentagefäße setzen sich die erniedrigten Blutdruckwerte über die komplette erste Lebenswoche fort (Yanowitz et al., 2004).

In zahlreichen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Lipopolysaccharide aus Bakterien-Endotoxinen das neonatale Gehirn für hypoxisch-ischämische Ereignisse sensibilisieren (Ando et al., 1988; Eklind et al., 2001).

Freie Radikale und Exzitotoxizität

Freie Radikale werden Atome oder Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron bezeichnet. Sie gelten als besonders reaktionsfreudig und spielen bei biologischen Prozessen eine wichtige Rolle, sind aber auch dafür bekannt, dass sie durch Oxidation Zellschäden hervorrufen können.

Hypoxie und Inflammation/ Infektion aktivieren alleine oder gemeinsam die nachgeschalteten Mechanismen Exzitotoxizität und den Angriff durch die freien Radikale ROS und reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS). Mit Exzitotoxizität wird der Tod einer Nervenzelle durch anhaltende Reizüberflutung bezeichnet, dabei werden Glutamatrezeptoren aktiviert und schütten so große Mengen an Neurotransmittern aus, dass es zum vermehrten Kalzium-Einstrom in die Prä-OL kommt. Es wird die Produktion von ROS und RNS initiiert. Der Angriff durch freie Radikale und Exzitotoxizität ist besonders schädlich für die sich noch entwickelnde weiße Substanz des Gehirns (Khwaja & Volpe, 2008).

Unter oxidativem Stress versteht man eine Stoffwechsellage, bei der es zu einem Übergewicht von reaktiven Sauerstoffverbindungen kommt. Aus dem reaktionsfreudigen Sauerstoff entstehen hochgradig reaktionsbereite Sauerstoffverbindungen: Superoxid-Anionen-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikal.

Hyperoxie, als eine von vielen Ursachen für oxidativen Stress gilt als wichtiger Auslöser von perinataler Hirnschädigung (Back et al., 1998; Baud, Haynes, et

al., 2004; Baud, Li, et al., 2004; Deulofeut et al., 2006; Felderhoff-Mueser et al., 2004; Gerstner et al., 2008). Vermehrter Anfall von ROS durch erhöhten oxidativen Stress führt zu vermehrten Zelltod *in vitro* und *in vivo* (D'Agostino et al., 2007; Gerstner et al., 2008; Kwak et al., 2006; Mori et al., 2007). Besonders Prä-OL vor Beginn der Myelinisierung werden durch ROS geschädigt, reife OL sind resistent dagegen (Baud, Greene, et al., 2004; Baud, Haynes, et al., 2004; Baud, Li, et al., 2004).

Analog zu ROS gibt es auch nitrosativen Stress, der durch folgende Moleküle verursacht wird: Stickoxid-Radikal und Peroxinitrit.

Durch die katalytische Funktion des Enzyms NO-Synthase (NOS) wird in den Zellen das relativ stabile Radikal NO[•] gebildet. Bei der humanen diffusen PVL konnte vor allem in reaktiven Astrozyten beobachtet werden, dass die Zahl der Glia-Zellen, die positiv für induzierbare NO-Synthase (iNOS, Synonym NOS-2) getestet wurden, signifikant stieg und sie somit als potente NO-Quelle fungieren (Haynes et al., 2005). Die Hauptquelle für NO scheint der reaktive Astrozyt zu sein. Dieses Molekül scheint einen großen Teil des nitrosativen Stresses bei PVL auszumachen (Haynes et al., 2003). Sich in Entwicklung befindende OL sind empfindlicher gegenüber NO als reife OL (Baud, Greene, et al., 2004; Baud, Haynes, et al., 2004; Baud, Li, et al., 2004).

Glutathion wird chemisch als γ-Glutamyl-Cysteinyl-Glycin bezeichnet und kann in folgenden Formen vorliegen: als reduzierte Form des Glutathion (GSH) und als oxidierte Form des Glutathion (GSSG).

Glutathion reduziert reaktive Sauerstoffverbindungen und schützt die Zelle so vor freien Radikalen.

Einfluss freier Radikale auf die Entwicklung der OL

In Gehirnen von früh- und reifgeborenen Kindern mit PVL zeigt sich, dass in den diffusen Läsionen der PVL in den Prä-OL eine Schädigung durch Oxidation und Nitrierung stattfand. Die so entstandenen freien Radikale vernichteten die Prä-OL, nicht aber die reaktiven Astrozyten (Haynes et al., 2003). Jelinski et al. vermuten, dass die erhöhte Vulnerabilität sich entwickelnder OL gegenüber ROS nach einem hypoxisch-ischämische Ereignisse zur Entstehung einer PVL beitragen (Jelinski et al., 1999).

Back et al. beschreiben, dass Prä-OL eine höhere Anfälligkeit haben, verglichen mit reifen OL, durch den Angriff freier Radikale zu Grunde zu gehen. Der

Angriff durch die freien Radikale kann durch Glutathion-Depletion oder exogenes ROS begünstigt sein (Back et al., 1998). Die Empfindlichkeit der OL gegenüber Angriffen durch freie Radikale ist entwicklungsabhängig. Für Prä-OL ist oxidativer Stress toxischer. Sie bilden und sammeln mehr freie Radikale an als reife OL (Back et al., 1998). Scheinbar können OL-Vorläufer unzureichend mit freien Radikalen umgehen, was erklärbar durch eine verzögerte Entwicklung und Reaktivität der antioxidativen Abwehr, besonders der Glutathion-Peroxidase und der Katalase wäre. Dies konnte in experimentellen Modellen, aber auch die Analyse menschlicher Gehirne bestätigt werden (Iida et al., 1995; Volpe, 2009).

1.7 Zusammenhang PVL und ROP

PVL und ROP treten bei Frühgeborenen häufig zusammen auf, jedoch ist die Korrelation dieser Erkrankungen bis jetzt nur wenig untersucht.

Schon Hungerford et al. sahen, dass das Auftreten einer ROP deutlich assoziiert war mit dem Vorliegen einer zerebralen Schädigung. Sie vermuteten, dass die der ROP zugrunde liegende Veränderung eine hypoxisch-ischämische Schädigung der retinalen Gefäßversorgung sein könnte (Hungerford et al., 1986). 1989 wurde die Assoziation von ROP und PVL beschrieben und postuliert, dass die Hypoperfusion eine zerebrale Ischämie hervorrufen könne und eine sowieso schon eingeschränkte Blutversorgung des Auges noch verschlechtere. Die retinale Ischämie würde somit verstärkt und der Schweregrad der ROP nähme zu (Y. K. Ng et al., 1989).

Auch klinisch bestätigt sich dies, Kinder mit ROP haben ein höheres Risiko motorische und psychomotorische Defizite zu zeigen als Kinder ohne ROP. Dafür sind wahrscheinlich gemeinsame Risikofaktoren verantwortlich (Allred et al., 2014). In einer anderen Untersuchung hatten 17 % der ROP-Patienten auch eine PVL, die Kombination der Erkrankungen erhöhte den Grad der ROP nicht (Huang et al., 2012). In einer anderen Kohorte hatten 27 % der ROP-Patienten ebenfalls eine PVL (Yang et al., 2010).

Aus den beschriebenen Zusammenhängen ergibt sich somit die Notwendigkeit der weiteren Untersuchung dieser beiden bedrohlichen und schwerwiegenden Erkrankungen des Frühgeborenen. Bis dato gibt es kein gemeinsames Tiermodell für diese Pathologien. Im Rahmen des Gesamtprojektes wurden an einem

etablierten PVL-Modell Untersuchungen an Gehirn und Auge durchgeführt werden, wobei die vorliegende Arbeit die Veränderungen am Gehirn zum Thema hat.

1.8 Das sich entwickelnde Gehirn im Tiermodell

Einen Grundstein für die Etablierung von Tiermodellen zur Erforschung des sich in der Entwicklung befindlichen Gehirns legten Dobbing und Sands (Dobbing & Sands, 1979). Sie verglichen die Gewichtszunahme in der Entwicklung befindlicher Gehirne verschiedener Säugetiere und des Menschen miteinander. Tiere und Menschen wurden nach den Höhepunkten des Gehirnwachstums in pränatale, perinatale und postnatale Entwickler eingeteilt. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Spezies war schwierig, da die Lebenserwartung sehr unterschiedlich ist. Deshalb ist in der Grafik jede Spezies in einer eigenen Zeiteinheit aufgetragen.

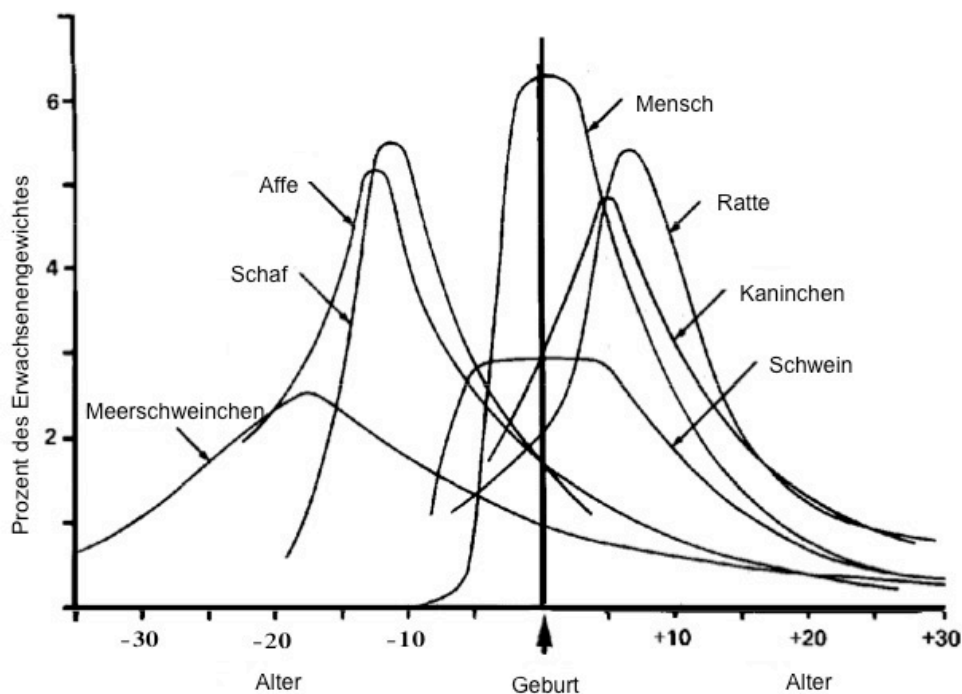


Abbildung 5: Vergleichende Aspekte der Gehirnwachstumskurven

Modifiziert nach Dobbing und Sands (Dobbing & Sands, 1979)

Wachstumsschub des Gehirns von 7 Säugetierarten, ausgedrückt in einer Geschwindigkeitskurve 1. Ordnung des Anstiegens des Körpergewichtes mit Alter;

Meerschweinchen: Tage, Rhesus-Affe: 4 Tage, Schaf: 5 Tage, Schwein: Wochen; Mensch: Monate, Kaninchen: 2 Tage, Ratte: Tage

Wachstumsrate ist ausgedrückt als Gewichtszunahme (in Prozent des erwachsenen Körpergewichtes) pro Zeiteinheit

Ein Großteil der Gewichtszunahme des Gehirns findet bei der Ratte postnatal statt. Im Vergleich mit dem Gewicht des erwachsenen Gehirns sind Ratte und

Mensch sich am ähnlichsten. Das menschliche Gehirn hat seinen Höhepunkt der Gewichtszunahme ungefähr in der Mitte der 280 Tage dauernden Schwangerschaft, das weitere Wachstum zieht sich bis ins dritte postnatale Jahr. Das Gehirnwachstum eines menschlichen Frühgeborenen verläuft etwa parallel zu dem einer neugeborenen Ratte (Dobbing & Sands, 1979; Semple et al., 2013).

1.9 Tiermodelle für PVL

Für PVL gibt es nicht nur Modelle an Ratten und Mäusen, sondern auch an Schafen und an Pavianen (Back, Riddle, et al., 2006; Dieni et al., 2004; Hagberg et al., 2002; Hagberg et al., 2004; Ohshima et al., 2012; Rice et al., 1981; Sheldon et al., 1998). Die Vorteile bei Schafen und Pavianen bestehen darin, dass ihre Gehirnentwicklung und Morphologie teilweise ähnlicher der des Menschen sind als bei Nagetieren. Eine vorzeitige Entbindung (im Sinne von Frühgeburtlichkeit) und damit verbundenes Überleben ist gut möglich (Ferriero, 2006). Obwohl die Gehirnentwicklung und Morphologie bei Pavianen und Schafen dem Menschen ähnlicher sind, werden wahrscheinlich wegen einfacherer Haltung und kürzerer Lebensdauer weiterhin Ratten für den Großteil der Studien verwendet.

Beim Menschen liegen bereits pränatal reichlich unreife OL vor und die Myelinisierung beginnt früh im letzten Trimester. Bei der Ratte liegen erst in der ersten postnatalen Woche reichlich unreife OL vor und die Myelinisierung beginnt 2 Wochen postnatal. Damit ist die reifgeborene Ratte in diesen Aspekten ein adäquater Vergleich zum menschlichen Frühgeborenen (Reynolds & Hardy, 1997).

1.9.1 Das Rice-Vannucci-Modell

Bei erwachsenen Ratten reicht Anoxie alleine nicht aus, um einen Schaden im Gehirn zu erzeugen. Die Kombination von Anoxie mit einem unilateralen Verschluss der *A. carotis* führt zu ischämischen Veränderungen der ipsilateralen Hemisphäre. Diese Intervention ist als Levine-Methode bekannt geworden (Levine, 1960). Auch bei neonatalen Ratten wurde festgestellt, dass Anoxie alleine nicht zur Schädigung des Gehirnes führt (Hicks et al., 1962).

1981 wurde das Rice-Vannucci-Modell vorgestellt. Es diente der Erforschung von Gehirnschäden bei neonatalen Ratten. 7 Tage alte Ratten erhielten in Narkose eine Karotisligatur und wurden gegenüber verschiedenen Sauerstoffkon-

zentrationen exponiert. 79 % der Tiere überlebten 3½ Stunden bei einer Konzentration von 8 % Sauerstoff und waren auch 48 Stunden nach dem Eingriff noch nicht verstorben (Rice et al., 1981).

Das Rice-Vannucci-Modell wurde inzwischen auch auf die Maus an unterschiedlichen Lebensstagen übertragen, da für dieses Tier deutlich mehr transgene Linien etabliert sind als für die Ratte. Mäuse reagieren je nach Stamm empfindlicher oder resistenter gegenüber Ischämie + Hypoxie (Hagberg et al., 2004; Ohshima et al., 2012; Sheldon et al., 1998). Durch dynamische Untersuchungen des CBF zeigte sich, dass der Schaden im Gehirn nach Ischämie + Hypoxie bei Ratten variabler ist als bei Mäusen (Charriaut-Marlangue et al., 2013).

Im Rice-Vannucci-Modell fallen in der weißen Substanz vor allem Schäden an den dorsalen Orten der Myelinisierung auf. Diese erstrecken sich entlang der Ausbreitung des Balkens nach lateral, wo sich auch normale OL finden, aber auch viele Zellen mit vakuolisiertem Zytoplasma. Diese Ergebnisse ähneln in vielen Aspekten denen der PVL, die durch Banker und Larroche erstmalig mit dem Begriff PVL bezeichnet wurden (Banker & Larroche, 1962). Das Rice-Vannucci-Modell etablierte sich so als Tiermodell für PVL (Rice et al., 1981).

Laut Romijn et al. ist der Grad der funktionellen Maturation des Kortex eines reifgeborenen humanen Kindes am besten vergleichbar mit dem einer 12 bis 13 Tage alten Ratte, da sich die elektrokortikale Aktivität zu diesem Zeitpunkt am meisten ähnelt. Um P7 bis P10 hat die neonatale Ratte die höchste Vulnerabilität gegenüber der Toxizität von Glutamat und Hypoxie-Ischämie, wobei beim Menschen dieser Zeitpunkt pränatal liegt (Romijn et al., 1991). Viele Aspekte der Gehirnreife einer 7 Tage alten Ratte stimmen mit denen eines menschlichen Feten im dritten Trimester der Schwangerschaft überein (Clancy et al., 2001; Clancy et al., 2007).

Im Laufe der Zeit wurden immer mehr Tiere mit dem Menschen verglichen in Bezug auf die Gehirnentwicklung, aber auch auf andere Parameter. So entwickelten Workman und Mitarbeiter einen Rechner, der verschiedene Säugetiere in ihrer neurologischen Entwicklung untereinander und mit dem Menschen vergleicht. Dort kann man z. B. berechnen, dass P6 (Tag 27 *post conceptionem*) der Ratte der Myelinisierung des Gehirns der eines 29 SSW reifen Menschen entspricht (Workman et al., 2013).

Interessanterweise haben Ratten, die jünger als 3 Tage sind eine niedrigere Vulnerabilität als ältere Tiere (Grafe, 1994). Auch Ratten die älter als 6 Tage sind, sind weniger vulnerabel gegenüber Ischämie + Hypoxie. Der Höhepunkt der Schädigung ist an P6 erreicht und betrifft vor allem den frontalen und parietalen Kortex. Die kontralaterale Seite ist weniger stark in der gleichen Region betroffen. Bemerkenswerterweise kommt es bei den Tieren bis P6 nach hypoxisch-ischämischer Intervention auch zu signifikanten intrazerebralen Blutungen. Dies ist eine weitere Parallele zum Menschen, wo der perinatale Gehirnschaden auch oft von Blutungen ins Gehirn begleitet wird. Erklärbar ist dies darüber, dass die periventrikulären Neurone, die direkt unter der germinalen Matrix liegen, besonders empfindlich zu diesem Zeitpunkt sind. Aus der Klinik ist bekannt, dass dies oft der Ort von intrazerebralen Blutungen beim Frühgeborenen ist (Ikonomidou et al., 1989).

Es gibt verschiedene Tiermodelle für PVL durch Karotisligatur. Dieser Eingriff führt an verschiedenen Lebensstagen zu unterschiedlichen Schädigungen:

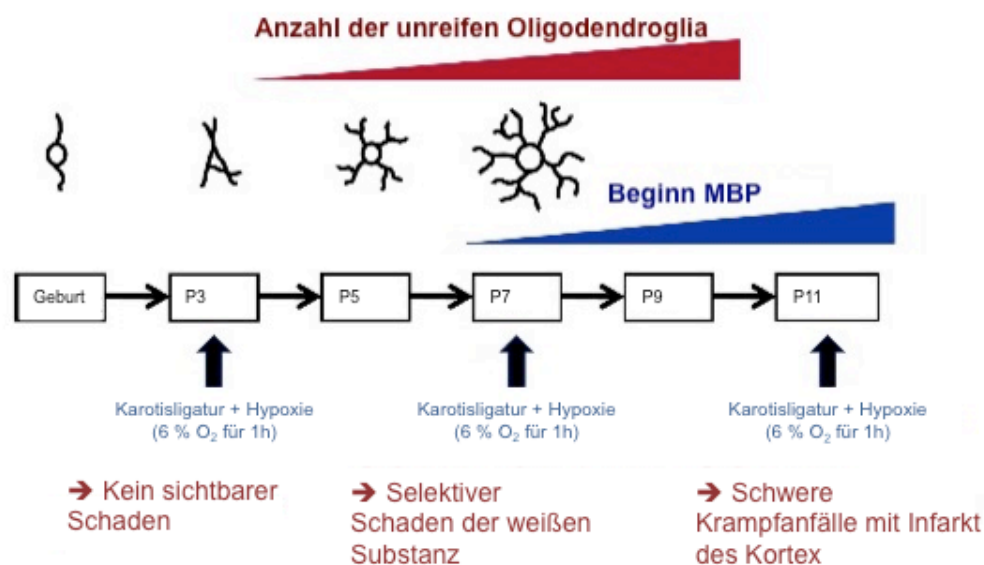


Abbildung 6: Zeitpunkte für Karotisligatur und folgende Erkrankung

Modifiziert nach Choi (Choi et al., 2011)

Entwicklungsstadienabhängige PVL bei Nagetieren induziert durch Ischämie + Hypoxie

P: postnataler Tag

Unterschieden werden verschiedene Methoden zur Schädigung des Gehirns – die hypoxisch-ischämische Variante durch Karotisligatur und Hypoxie, die Injektion von Bakterien oder Lipopolysaccharide und die Applikation von exzitotoxischen Substanzen.

Es gibt morphologische Unterschiede zwischen PVL, die durch Infektion entstanden sind, und der PVL, die durch Ischämie entstanden sind. Vermutlich hat die Form der Schädigung auch klinische Relevanz.

Langezeitbeobachtungen im Rice-Vannucci-Modell zeigen, dass Ratten im Alter von 3 Monaten eine eingeschränkte Beweglichkeit an der vorderen Extremität, kontralateral zur Karotisligatur an P7 haben (Tomimatsu et al., 2002). Ischämie + Hypoxie führt auch zu Einschränkungen des räumlichen Lernens, je länger das Tier nach Intervention überlebt, desto stärker ist die histologische und neurologische Schädigung (Mishima et al., 2005).

1.9.2 Nachweis von MBP (Myelin-Basis-Protein) bei der neonatalen Ratte

Verschiedene Antikörper können zum Nachweis verschiedener Zelltypen im zeitlichen Verlauf und ihrer Lokalisation im Gehirn der neonatalen Ratten verwendet werden. Die ersten MBP-Nachweise werden an P2 durch Antikörper sichtbar. Ab P3 ist deutlich mehr MBP nachweisbar, vor allem im Bereich der Ventrikel und in der subventrikulären Zone. Ab P6 exprimieren mehr Zellen MBP, vor allem in der weißen Substanz, die an den lateralen Ventrikel grenzt. Allerdings sind die Myelin-Scheiden noch kurz, vor allem lateral und distal der subventrikulären Zone.

Von P9 bis P12 laufen Myelin-Scheiden entlang des *Corpus callosum*, vom *Cingulum* bis zum lateralen Ventrikel. Zwischen P15 und P20 ist reichlich MBP im Bereich des *Corpus callosum* nachweisbar, auch vom *Cingulum* aus ziehen Myelinscheiden in Richtung Kortex (Follett et al., 2000; Hardy & Reynolds, 1991).

1.9.3 MBP-Expression im Rice-Vannucci-Modell

Im modifizierten Rice-Vannucci-Modell gibt es Verluste der MBP-Expression in den OL, die in den Kortex auslaufen, außerdem eine verminderte Dicke der weißen Substanz periventrikulär und in der *Capsula externa* an P11. Zur Beurteilung des MBP wurde ein Score mit 3 Graden eingeführt (Follett et al., 2000). Dieser Score wurde von Gerstner et al. auf 5 Grade erweitert (Gradeinteilung siehe 2.7.6 MBP-Score). Ratten, die an P3 und P6 über 24 Stunden mit 80 % Sauerstoff behandelt wurden entwickeln ebenfalls einen MBP-Verlust im Vergleich zur normoxischen Exposition (Gerstner et al., 2008).

Auf den Erkenntnissen von Gerstner et al. basiert der hier beschriebene Versuch (Gerstner et al., 2009).

1.9.4 Schädigung der kontralateralen Seite im Rice-Vannucci-Modell

Das Rice-Vannucci-Modell basiert auf dem Levine-Modell und ist histologisch sehr gut belegt. Es zeigt vor allem Schädigungen des parietalen Kortex, des Hippocampus sowie Striatum und Thalamus ipsilateral zur Intervention (Levine, 1960; Rice et al., 1981).

Bei vielen Autoren war nur die ipsilaterale Seite zur Intervention betroffen (Ikeda et al., 2001; Jansen & Low, 1996; Yokoyama et al., 2004). Mit verfeinerten Methoden ließ sich nachweisen, dass in der kontralateralen Hemisphäre zur Schädigung die Fähigkeit zu antioxidativen Vorgängen langfristig reduziert war (Yokoyama et al., 2004).

1.9.5 Genexpression im Rice-Vannucci-Modell

Um die molekularen Hintergründe besser zu verstehen, wurde die Genexpression im Kortex der Gegenseite per *Microarray* untersucht. Dabei wurde eine Hochregulation der Gen-Gruppen beobachtet, die für die Vermittlung von Zelltod zuständig sind. Die Gene, die für die Gen-Expression zuständig sind, waren herunterreguliert als Ausdruck des progredienten Schadens des hypoxisch-ischämischen Insultes (Kojima et al., 2013).

In einem reinen Hypoxie-Versuch an neonatalen Ratten zeigte sich die Expression von HIF-1 α , VEGF und NOS-2 im *Corpus callosum* erhöht. In Mikroglia war vor allem die NOS-2-Expression aktiviert, während in Astrozyten vor allem VEGF vorkam. Die VEGF-Konzentrationen blieben im *Corpus callosum* bis zu 7 Tage nach der Hypoxie erhöht, NOS-2 blieb sogar bis zu 14 Tage erhöht nachweisbar. In der Zeit zwischen 3 Stunden und 7 Tage nach der Hypoxie gingen die meisten Axone zugrunde. Das legt nahe, dass die vermehrte Expression von VEGF und NOS-2 eine wichtige Rolle in der Entstehung von PVL durch Hypoxie hat (Kaur et al., 2006). NOS-2 wird in den Gehirnen von PVL-Patienten in erhöhter Dichte gefunden. In reaktivierten Astrozyten war NOS-2 im akuten und chronischen Stadium nachweisbar und in aktivierten Mikroglia vor allem in der akuten Phase. Somit scheint mikrogliales NOS-2 eine frühe Rolle in der Entstehung von PVL zu spielen (Haynes et al., 2009).

TNF α als proinflammatorisches Zytokin ist maßgeblich an Frühgeburtlichkeit beteiligt, vor allem wenn diese mit Infektionen assoziiert sind (Romero et al., 1992). Die Zytokine TNF α und IL1 β sind bei Auftreten von Ischämien im Gehirn erhöht (Rothwell & Relton, 1993). Menschliche neonatale Gehirne, die von PVL betroffen sind, exprimieren die TNF α -Rezeptoren an Parenchym-Zellen der weißen Substanz und an Endothel-Zellen von Gefäßen. In den PVL-freien Regionen konnte keiner der beiden Rezeptoren gefunden werden (Kadhim et al., 2006).

TNF α und andere Zytokine induzieren in einem Zellkultur-Modell HIF-1 α , wovon vorher nur bekannt war, dass es durch Hypoxie beeinflusst wurde. HIF-1 α spielt auf diesem Wege u.a. über TNF α auch eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen (Hellwig-Bürgel et al., 1999).

Unter hypoxischen Bedingungen zeigen VEGF und TNF α einen Anstieg (Karamysheva, 2008). VEGF nimmt so direkt an der Angiogenese teil, indem es endotheliale Zellen in hypoxischen und avaskulären Bereichen rekrutiert und ihre Proliferation stimuliert. Im VEGF-Transkriptionsverstärker (*Enhancer*) gibt es eine HIF-1 Bindungsstelle. Nachdem HIF-1 α mit HIF-1 β zu HIF-1 dimerisiert ist, bindet HIF-1 an den VEGF-Enhancer und vermittelt die Aktivierung der Transkription (Forsythe et al., 1996).

Nagai et al. zeigten *in vitro*, dass TNF α die Erythropoetin-Rezeptor-(Epo-R)-Expression erhöht (Nagai et al., 2001). TNF α inhibierte die Epo-Synthese und wirkte auf anderem Wege neurodegenerativ (Hellwig-Bürgel et al., 1999). Die Epo-R-Expression wird bei neonatalen Ratten mit einer permanenten fokalen Ischämie auf Proteinebene hochreguliert. Epo-R scheint maßgeblich bei Schädigungen des Gehirns während der Entwicklung beteiligt zu sein (Wen et al., 2004).

So spielen Epo-R, HIF-1 α , NOS-2, TNF α und VEGF eine wichtige Rolle bei inflammatorisch vermittelten neurodegenerativen Prozesse verursacht durch das Zusammenspiel zwischen Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie. Diese Faktoren gelten als wichtige Risikofaktoren in der Entstehung einer PVL bei Frühgeborenen. Somit sind die o.g. Gene besonders interessant.

1.10 Einfluss des Geschlechtes auf zerebrale Schädigungen

Klinische Studien vermitteln den Eindruck, dass das Geschlecht eines Neona-
ten seine Reaktion auf Schädigungen des Gehirns beeinflusse. Männliches Ge-
schlecht konnte als Risikofaktor für schlechteres neurologisches Outcome iden-
tifiziert werden (Marlow et al., 2005). Mit 8 Jahren haben frühgeborene Jungen
im Vergleich mit reifgeborenen Jungen in der MRT signifikant weniger weiße
Substanz. Dieser Zusammenhang tritt beim weiblichen Geschlecht nicht auf
(Reiss et al., 2004). Bei Deulofeut et al. konnten frühgeborene Mädchen hyper-
oxische Situationen besser kompensieren, sie hatten weniger BPD und ROP
(Deulofeut et al., 2007).

Somit stellt sich die Frage, ob das Geschlecht einen Einfluss im Tiermodell für
PVL haben könnte, was im ursprünglichen Rice-Vannucci-Modell noch nicht
untersucht wurde (Rice et al., 1981).

1.11 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie auf das unreife Gehirn der Ratte durch immunhistochemische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen zu untersuchen.

Dabei wurden die folgenden Hypothesen aufgestellt:

- Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie haben einen Einfluss auf die Markscheidenausbildung durch die OL (MBP-Expression)
- Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie verändern die Genexpression von Epo-R, HIF-1 α , NOS-2, TNF α und VEGF-A164
- Geschlechtszugehörigkeit hat einen Einfluss auf die Schädigungen durch Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie und die MBP-Expression, sowie die Genexpression von Epo-R, HIF-1 α , NOS-2 , TNF α und VEGF-A164.

2 Methodik

2.1 Teilbereiche des Projektes

Die vorliegende Promotion ist ein Teilprojekt einer Studie zum Einfluss von Sauerstoff auf das unreife Gehirn und die unreife Retina bei der neonatalen Ratte, die in Kooperation zwischen der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Philipps-Universität Marburg und der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt wurde. Die Tierversuche sowie die Aufarbeitung der Gehirne erfolgten in Marburg, die Aufarbeitung der Augen in Gießen.

2.2 Tiere und Haltung

Für die Versuche wurden trächtige Long-Evans-Ratten vom Wildtyp der Firma Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) bestellt. Die Ratten wurden in den Räumlichkeiten des „Biomedizinischen Forschungszentrum“ (BMFZ) der Philipps-Universität Marburg gehalten und im 12-Stunden-Tag-Nacht-Lichtzyklus *ad libitum* mit Futter und Wasser versorgt. Die terminiert verpaarten Long-Evans-Ratten-Weibchen warfen nach ca. 21 bis 23 Tagen Tragedauer bis zu 15 Welpen. Der Wurfstag wurde als postnataler Tag 1 (P1) dokumentiert. Bis zu P6 erfolgte außer täglichen Besuchen keine Intervention.

Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) zwischen November 2011 und Oktober 2013 in einem S2-Labor durchgeführt. Die Genehmigung der Versuche erteilte das Regierungspräsidium Gießen im Namen des Landes Hessen mit den Aktenzeichen V54-19c2015(1) MR20/14 Nr. 31/2011 und V54-19c2015h01 MR20/14 Nr. 93/2012.

2.3 Versuchsaufbau und Interventionsgruppen

Die Rattenwelpen wurden in 4 Gruppen eingeteilt:

- Gruppe A (Ischämie + Hypoxie)
- Gruppe B (Hyperoxie)
- Gruppe C (Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie)
- Gruppe D (Normoxie) als Kontrollgruppe

In jeder Gruppe befanden sich 5 Tiere für die verschiedenen postmortalen Untersuchungen.

Wegen der erwarteten unterschiedlichen Schädigungen der Hirnhemisphären nach Karotisligatur wurde zwischen links und rechts unterschieden. Ischämie ist im Folgenden gleichbedeutend mit linkseitiger Karotisligatur.

Tabelle 2: Abkürzungen für Interventionsgruppen

Abkürzung	Gruppe	Intervention
A-L	Ischämie + Hypoxie links	Karotisligatur links + Hypoxie (1 h in 6 % O ₂)
A-R	Ischämie + Hypoxie rechts	Karotisligatur links+ Hypoxie (1 h in 6 % O ₂)
B	Hyperoxie	Nur Hautschnitt + Hyperoxie (24 h in 80 % O ₂)
C-L	Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links	Karotisligatur links + Hypoxie (1 h in 6 % O ₂) + Hyperoxie (24 h in 80 % O ₂)
C-R	Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts	Karotisligatur links + Hypoxie (1 h in 6 % O ₂) + Hyperoxie (24 h in 80 % O ₂)
D	Normoxie	Nur Hautschnitt – Kontrollgruppe

O₂: Sauerstoff

2.3.1 Intervention an postnatalem Tag 6 (P6)

An P6 erhielten die Rattenwelpen der Gruppe Ischämie + Hypoxie (A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C) eine Ligatur der linken *A. carotis communis* in Narkose. Nach kurzer Erholung von der Narkose und OP verbrachten die Tiere die erste postoperative Stunde in einer Kammer mit 6 % Sauerstoffkonzentration. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Welpen zurück zu ihrer Mutter gebracht.

Die Tiere der Gruppen Hyperoxie (B) und Kontrollgruppe (D) erhielten in Narkose nur einen Hautschnitt und keine Karotisligatur und kehrten danach direkt zur Mutter zurück.

Die Tiere der Gruppen Hyperoxie (B) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C) verbrachten die nächsten 24 Stunden gemeinsam mit ihrer Mutter in einer abgedichteten Kammer, in der eine Sauerstoffkonzentration von 80 % herrschte. An P7 wurde die Hyperoxie der Gruppen B und C beendet und die Tiere mit ihrer Mutter gemeinsam in einen herkömmlichen Käfig umgesetzt.

2.3.2 Zeitliche Abfolge der verschiedenen Untersuchungen

In jeder Gruppe befanden sich 5 Tiere. An P7 erfolgte die Dekapitation eines Welpen aus jeder Gruppe (A, B, C und D) für molekularbiologische *in-vitro*-Untersuchungen an Augen und Gehirn. Aus Gründen der Praktikabilität wurde der beschriebene Versuch zwischen November 2011 und Oktober 2013 mehrmals wiederholt.

An P11 wurde bei je einem Welpen aus jeder Gruppe (A, B, C und D) als *in-vivo*-Untersuchungen eine Fluoreszenz-Angiografie der Augen und eine MRT-Untersuchung des Gehirns in Narkose durchgeführt. Jeweils das gleiche Tier erhielt an P21 eine Verlaufsuntersuchung der Augen und des Gehirns mit den o.g. Methoden. Danach wurde es für immunhistochemische Untersuchungen an Augen und Gehirn getötet. Die Daten der immunhistochemischen Untersuchungen von P21 und die MRT-Untersuchungen sind Gegenstand anderer Arbeiten.

Für *in-vitro*-Untersuchungen wurde an P11 jeweils ein Tier aus jeder Gruppe für molekularbiologische (Genexpressionsanalyse) und immunhistochemische Untersuchungen an Augen und Gehirn getötet.

Das letzte jeweils verbliebene Tier der Gruppen A, B, C und D fand Verwendung für molekularbiologische Untersuchungen an Augen und Gehirn an P21.

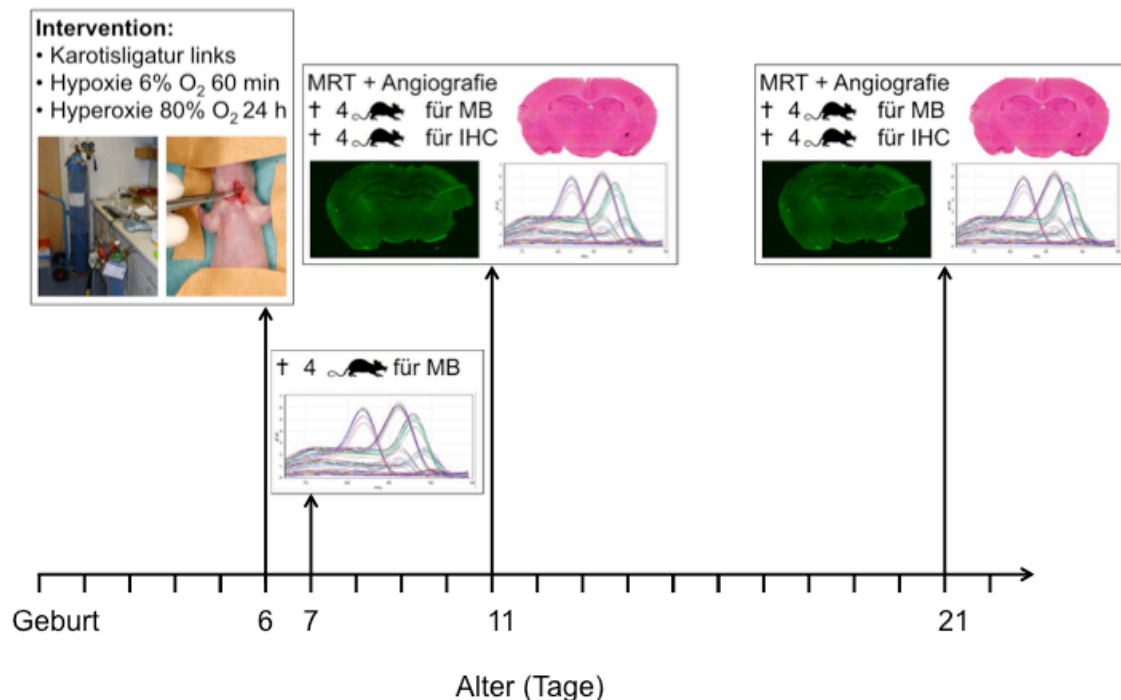


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf

MRT: Magnetresonanztomografie

IHC: Immunhistochemie (MBP-Expression)

MB: Molekularbiologie (Genexpressionsanalyse)

Insgesamt wurden 107 Tieren in den Versuch eingeschlossen, 48 Tiere für molekularbiologische Untersuchungen und 59 für immunhistochemische Untersuchungen (P11: 31 Tiere, P21: 28 Tiere).

2.4 Tierversuch

2.4.1 Pharmakologische Interventionen

Anästhesie

An P6 wogen die Rattenwelpen zwischen 8 und 12 g. Diejenigen, die weniger als 8 g wogen, wurden vom Versuch ausgeschlossen.

Die Tiere wurden mit der vorbereiteten Anästhesielösung gewichtsadaptiert intraperitoneal (i.p.) mit einer 30-G-Kanüle betäubt. Die vollständig-antagonisierbare Anästhesie (VAA) mit Midazolam, Medetomidin und Fentanyl fand Verwendung, da sie ein schnelles Aufwachen möglich machte und die Tiere rasch zur Mutter zurückkehren konnten. Außerdem gilt sie als gut steuerbar und hat eine gute analgetische, hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung.

Die für ausgewachsene Ratten empfohlene Dosierung von Fentanyl (0,005 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Medetomidin (0,15 mg/kg) wurde zunächst nach Körpergewicht (KG) der neonatalen Ratten verabreicht, da es in der Literatur keine speziellen Empfehlungen für die Dosierung einer VAA bei neugeborenen Ratten gibt (Henke & Erhardt, 2011). Die Narkosetiefe wurde mit einem für Tiere angepassten Schema geprüft und wurde gegebenenfalls durch Nachspritzen der Lösung vertieft (Petersen-Felix, 1998). Allerdings zeigte sich, dass die neonatalen Tiere im Vergleich zu erwachsenen Tieren in den vorliegenden Versuchen die doppelte Dosierung in Bezug auf ihr KG benötigten. Die Menge der Narkotika konnte reduziert werden, wenn die Medikamente länger Zeit hatten zu wirken bevor der Eingriff begann (siehe Anhang Tabelle 47 und Tabelle 48). Das empfohlene Injektionsvolumen für eine i.p.-Applikation bei Ratten beträgt 0,1 ml/ 10 g KG (<http://www.gv-solas.de/index.php?id=15>). Das maximale i.p.-Applikationsvolumen für eine einmalige Injektion beträgt 0,2 ml/ 10 g KG (Diehl et al., 2001).

Tabelle 3: Verdünnung VAA pro 10 g KG

Wirkstoff	Pro 10 g KG		Verdünnung mit 0,9 % NaCl
Fentanyl	0,03 ml Fentanyl - Anteil sollen 0,05 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 5 µg	0,1 ml kommerzielle Fentanyl - Lösung enthält 5 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 0,1 ml Fentanyl + 2,9 ml NaCl 0,9 % = 3 ml Gesamtverdünnung Fentanyl mit 5 µg Wirkstoff
Midazolam	0,03 ml Midazolam – Anteil sollen 20 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 2 mg	1 ml kommerzielle Midazolam – Lösung enthält 1mg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 2 ml Midazolam + 1 ml NaCl 0,9 % = 3 ml Gesamtverdünnung Midazolam mit 2 mg Wirkstoff
Medetomidin	0,03 ml Medetomidin sollen 1,5 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 150 µg	0,15 ml kommerzielle Medetomidin - Lösung enthalten 150 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 0,15 ml Medetomidin + 2,85 ml NaCl 0,9 % = 3 ml Gesamtverdünnung Medetomidin mit 150 µg Wirkstoff

KG: Körpergewicht

Jede Ratte wurde gewichtsadaptiert mit der gemischten VAA-Injektionslösung i.p. injiziert, mit einem maximalen Injektionsvolumen von 0,2 ml/ 10 g KG.



Abbildung 8: Anästhesie im Tierversuch

- 1 Rattenwelpen im Alter von 6 Tagen beim Wiegen
- 2 Mischung Sedierung und Antagonisierung
- 3 Rattenwelpen im Vergleich zu 1 ml Spritze
- 4 i.p.-Injektion

Antagonisierung

Zur Antagonisierung von Fentanyl an den Opioidrezeptoren diene Naloxon. Flumazenil wurde zur Antagonisierung von Midazolam durch kompetitive Verdrängung an zentralen Benzodiazepin-Rezeptoren und Atipamezol als Antagonisierung von Medetomidin durch spezifische Wirkung an zentralen und peripheren α_2 -Rezeptoren verwendet. Die Dosierungen wurden analog zu den Narkotika an das Gewicht neonataler Ratten angepasst.

Tabelle 4: Verdünnung VAA - Antagonisierung pro 10 g

Wirkstoff	Für 10 g KG		Verdünnung mit 0,9 % NaCl
Naloxon	0,03 ml Naloxon – Anteil sollen 1,2 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 120 µg	0,3 ml kommerzielle Naloxon – Lösung enthält 120 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 0,3 ml Naloxon + 2,7 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Naloxon mit 120µg Wirkstoff
Flumazenil	0,03 ml Flumazenil – Anteil sollen 2 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 200 µg	1 ml kommerzielle Flumazenil – Lösung enthält 100 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 2 ml Flumazenil + 1 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Flumazenil mit 200 µg Wirkstoff
Atipamezol	0,03 ml Atipamezol – Anteil sollen 7,5 µg Wirkstoff enthalten	3 ml = 750 µg	0,15 ml kommerzielle Atipamezol – Lösung enthält 750 µg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 0,15 ml Atipamezol + 2,85 ml NaCl = 3 ml Gesamtverdünnung Atipamezol mit 750 µg Wirkstoff

KG: Körpergewicht

Jeder Ratte wurde 0,1 ml pro 10 g KG der Antagonisierungslösung i.p. injiziert.

Analgesie

Jedes Tier erhielt zur postoperativen Schmerztherapie einmalig Metamizol (nicht-opioidhaltiges Analgetikum) i.p.. Die empfohlene Dosierung für Metamizol beträgt 100 mg/ kg KG (Henke & Erhardt, 2011).

Tabelle 5: Verdünnung Metamizol pro 10 g KG

Wirkstoff	Für 10 g KG		Verdünnung mit 0,9 % NaCl
Metamizol	0,1 ml Injektionslösung sollen 1mg Wirkstoff enthalten	2 ml = 1000 mg	2 ml kommerzielle Metamizol – Lösung enthalten 1000 mg Wirkstoff (siehe oben), d. h. 2 ml Metamizol + 98 ml NaCl = 100 ml Gesamtverdünnung Metamizol mit 1mg Wirkstoff

KG: Körpergewicht

Jeder Ratte wurde 0,1 ml pro 10 g KG der Metamizol-Lösung i.p. injiziert.

Tabelle 6: Arzneimittel für Narkose, Operation und Augenuntersuchung

Handelsname	Wirkstoff	Hersteller
Antisedan 5mg/ ml	Atipamezol	Janssen, Neuss, Deutschland
Domitor 1mg/ ml	Medetomidin	Janssen, Neuss, Deutschland
Dormicum V 5mg/5 ml	Midazolam	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Fentanyl 0,1mg	Fentanyl	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Flourescein Alcon	Flourescein	Flourescein Alcon, Freiburg, Deutschland
Flumazenil Inresa 0,5mg/ 5 ml	Flumazenil	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Isofluran Forene	Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Mydriaticum Stulln UD	Tropicamid	Pharma Stulln, Stulln, Deutschland
Naloxon Inresa 0,4mg	Naloxon	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %	Natriumchlorid	Braun, Melsungen, Deutschland
Novalminsulfon 1 g/2 ml	Metamizol	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Octenisept	Octenisept	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Proparacain POS 0,5 % Augentropfen	Procain	Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland
Pursept 0,5 %	Alkylbenzyltrimethylammoniumchlorid	Schülke, Norderstedt, Deutschland

2.4.2 Unilaterale Karotisligatur

Nach Applikation der VAA wurde den Rattenwelpen präoperativ die Körpertemperatur mit einem Mono Channel Rodent Thermometer (Bioseb, Pinellas Park, USA) gemessen. Zum Temperaturmanagement während der Operation wurde eine Wärmematte genutzt. Die Atmung und das Hautkolorit wurden klinisch überwacht.



Abbildung 9: Messung der Körperkerntemperatur

Die anästhesierten Tiere wurden auf einem sterilen Tuch mit Pflasterstreifen fixiert. Zur Unterscheidung der Gruppen wurde handelsübliche verschieden farbige Zeichentusche mit einer 30-G-Kanüle in eine Vorderpfote injiziert.

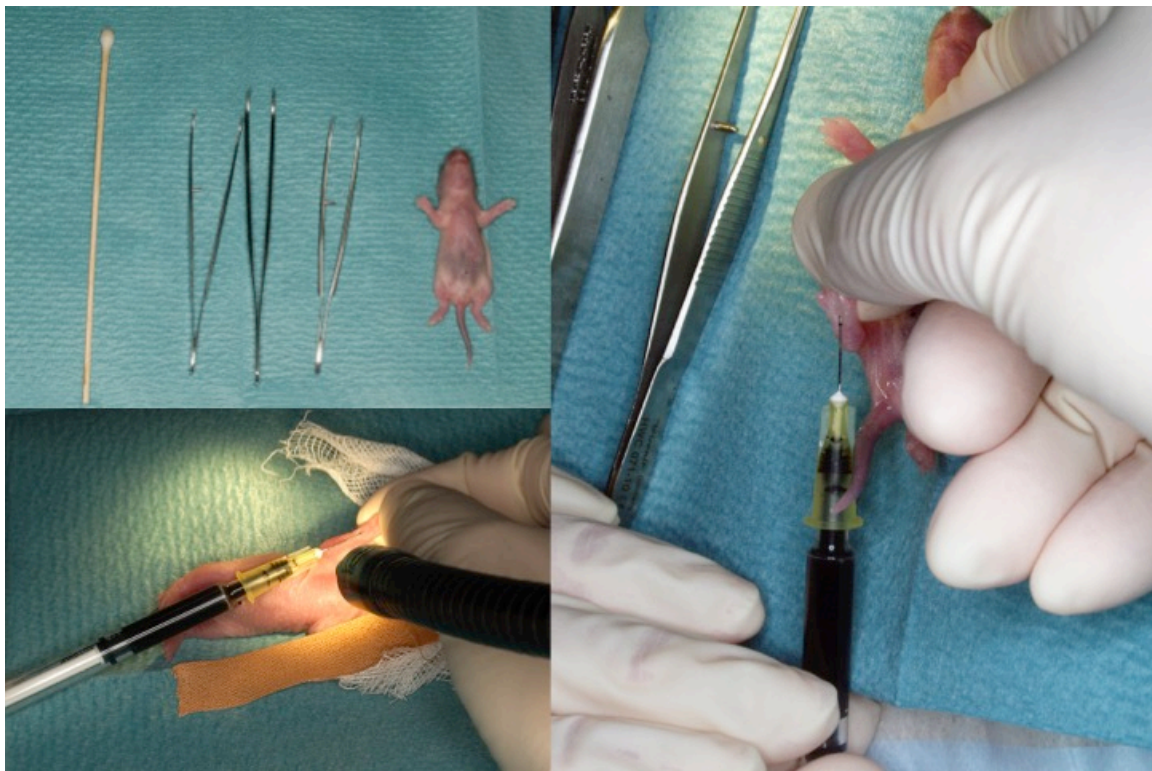
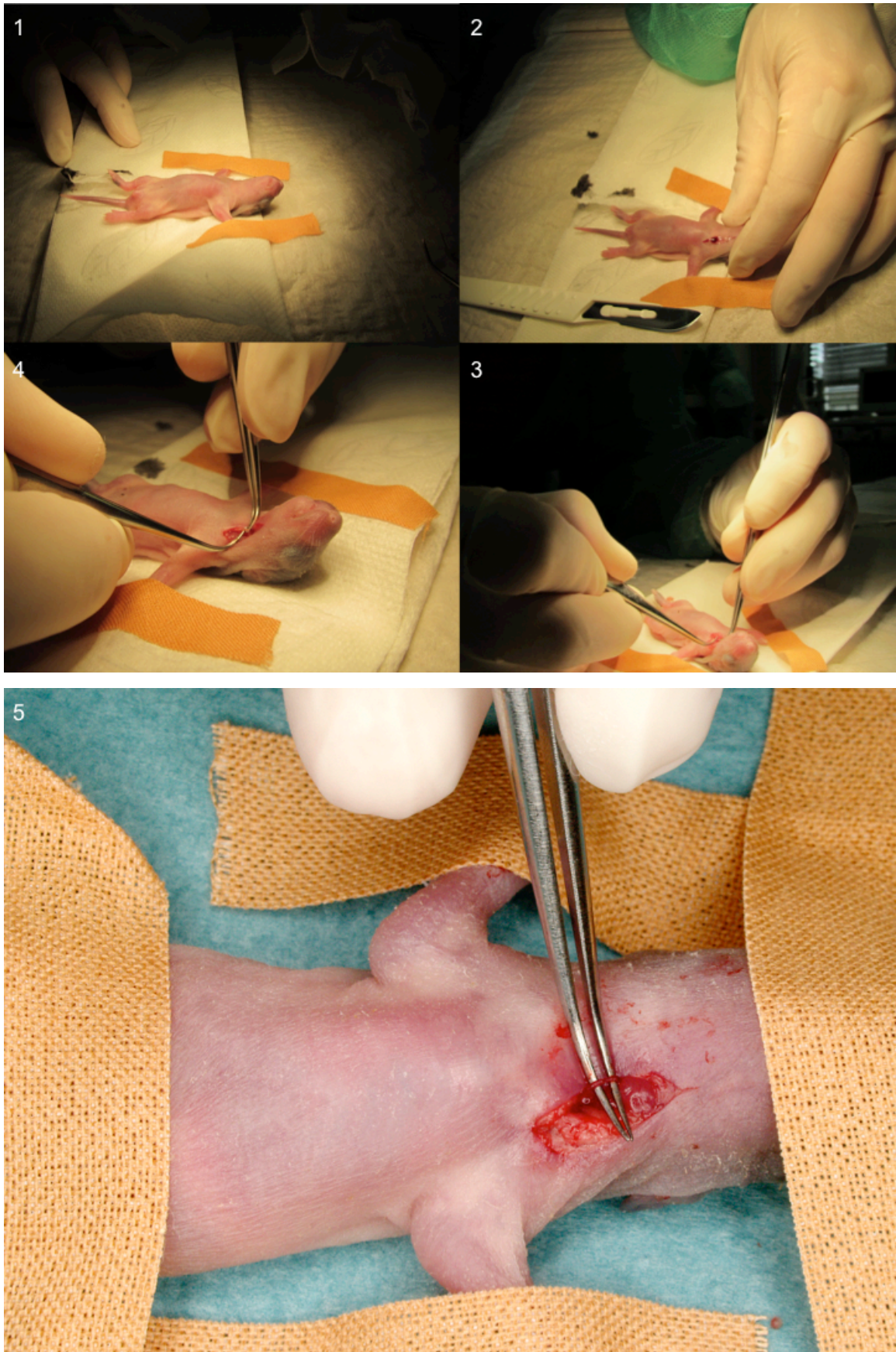


Abbildung 10: Tuscheinjektion

Die Haut im Bereich der linken Halsseite wurde mit Octenisept (Schülke, Nordstedt, Deutschland) desinfiziert. Unter einem Zeiss Stereo-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde ca. 5 mm paratracheal eine vertikale Inzision durch *Cutis* und *Subcutis* mit einem Einmalskalpell durchgeführt. Durch das Fettgewebe und die Weichteile wurde vorsichtig präpariert bis zum weißlich-erscheinenden *N. vagus*, der von der *A. carotis communis* begleitet wird. Die

Arterie kann von der in der Nähe laufenden Jugularvene durch ihre Pulsation unterschieden werden. Die Arterie und der Nerv wurden getrennt und das Gefäß vorsichtig auf eine Pinzette aufgeladen. Nach dem Spreizen der Pinzette erfolgte das vorsichtige Koagulieren des Gefäßes mit einem Elektrokauter Deluxe High Temperature Cautery Kit (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland). Die Hautwunde wurde durch Einzelknopfnähte mit nicht-resorbierbarem Fadenmaterial Prolene Ethicon 5-0 (Johnson & Johnson Medical GmbH Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Reinigung der umliegenden Haut erfolgte mit 0,9 % Natriumchlorid-Lösung und einem Wattestäbchen. Ungefähr 3-5 Minuten nach Applikation der Antagonisierung waren die Rattenwelpen wieder so wach, dass sie begannen sich fortzubewegen.

2.4.3 Unilaterale Karotisligatur in Bildern



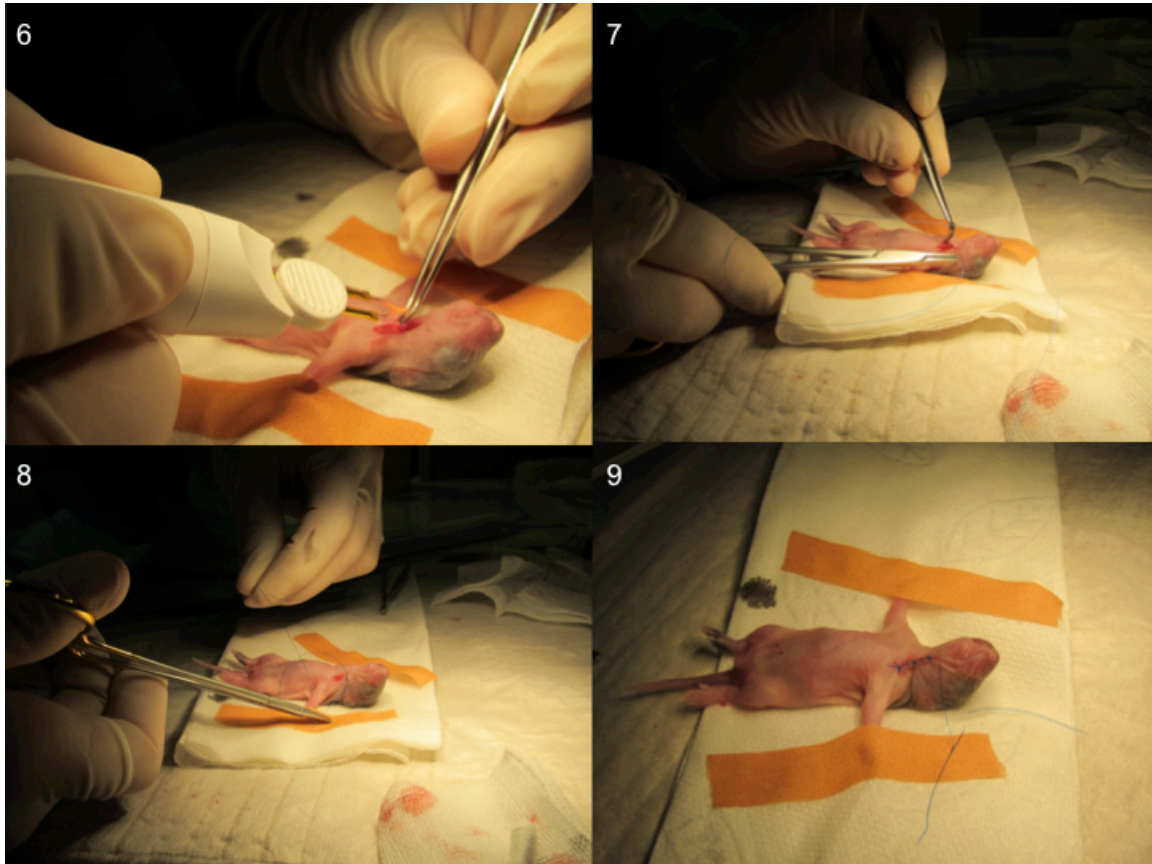


Abbildung 11: Karotisligatur

- 1 Fixieren des Welpen
- 2 Inzision paratracheal
- 3 Präparation durch Fettgewebe und Weichteile bis zum weißlich erscheinenden *N. vagus*, der von der *A. carotis communis* begleitet wird
- 4 Trennung von Arterie und Nerv und Aufladen des Gefäßes auf eine Bonn-45°-Pinzette
- 5 Darstellung der *A. carotis communis*
- 6 Koagulieren des Gefäßes mit Elektrokauter
- 7-9 Wundverschluss mit Einzelknopfnähten

2.4.4 Hypoxie und Hyperoxie

Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Tiere aus den Gruppen Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) auf Wärmekissen liegend in die speziell für diese Zwecke hergestellte Hypoxie-Kammer verbracht. Die Vorrichtung hatte 4 einzelne Schubladen und war luftdicht nach außen hin abgeschlossen. Die Kammer wurde auf einer Heizmatte deponiert. Über ein Luftsauerstoffgerät (Greisinger Electronic, Regenstauf, Deutschland) in der Decke der Kammer konnte kontinuierlich die Sauerstoffkonzentration gemessen werden. In die Hypoxie-Kammer wurde ein Gasgemisch der Firma Linde (Pullach, Deutschland) aus 6 % Sauerstoff und 94 % Stickstoff über einen Verbindungsschlauch und eine Befeuchtungseinheit zur Atemgasklimatisierung eingeleitet. Maximal 2 Tiere pro Schublade konnten für

60 Minuten in Hypoxie gelagert werden. Der Allgemeinzustand und die Atemtätigkeit der Rattenwelpen wurden dabei über die gesamte Zeit beobachtet und protokolliert.



Abbildung 12: Hypoxie-Phase

- 1 Hypoxie-Kammer mit Gasflasche
- 2 Hypoxie-Kammer mit Schubladen für Welpen
- 3 Hypoxie-Kammer mit Messgerät
- 4 Blick in eine Schublade der Hypoxie-Kammer mit 2 Welpen

Nach Beendigung der operativen Eingriffe wurden die Welpen der Gruppe Hyperoxie (Gruppe B) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) gemeinsam mit einer der Mütter in einen speziellen luftdichten Käfig verbracht und über 24 Stunden einer Konzentration von 80 % Sauerstoff ausgesetzt. Dafür wurde ein luftdichter Isolationskäfig (Isocage) der Firma Tecniplast (Casale Litta, Italien) benutzt, in welchen ein Gasgemisch aus 80 % Sauerstoff und 20 % Stickstoff der Firma Linde (Pullach, Deutschland) eingeleitet wurde. Das gewohnte Pelletfutter und Trinkwasser in Gelform (Diet Gel Boost Gelwasser, Clear H₂O, Westbrook, USA) sowie ausreichend Nistmaterial zur Lagerung der Welpen wurde der Rattenmutter für die 24-stündige Hyperoxie zur Verfügung

gestellt. Der Zustand der Tiere und die Konzentration des Sauerstoffs wurden im Laufe der 24 Stunden Hyperoxie mehrmals kontrolliert.



Abbildung 13: Hyperoxie-Phase

Rattenwelpen mit Mutter in Hyperoxie-Kammer mit Messung der Sauerstoffkonzentration über 24 Stunden

Nach Ablauf der Zeit wurden die Welpen und ihre Mütter zurück in herkömmliche Käfige gesetzt und in die Stallungen transportiert.

2.4.5 Tiertötungen

Dekapitation bzw. zervikale Dislokation für molekularbiologische Verfahren

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden an P7 die Rattenwelpen ohne vorherige Anästhesie mit einer Material-Schere (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) dekapitiert. An den Tagen P11 und P21 waren die Tiere schon zu groß zur alleinigen Anwendung dieses Verfahrens. Sie erhielten eine letale Dosis der VAA. Dann wurde die zervikale Dislokation durchgeführt.

Perfusion mit Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für immunhistochemische Untersuchungen

Für immunhistochemische Untersuchungen erfolgte eine Narkose mit einer Überdosis der VAA. Aufgrund der Toxizität der folgenden Schritte wurden die Welpen unter einen Laborabzug verbracht. Auf dem Rücken liegend wurden sie mit 20-G-Kanülen an den Extremitäten auf einer Styroporplatte fixiert. Mit einem Skalpell wurde die Haut zwischen Oberrand des Sternums bis zum Bauchnabel eröffnet und die darunterliegenden Schichten mit einer feinen Schere durchtrennt. Das Zwerchfell und beide Rippenbögen wurden parasternal von abdominal kommend eröffnet. Am freiliegenden, noch schlagenden Herzen wurde der linke Ventrikel mit einer Butterfly-Kanüle punktiert (Multifly Kanülenset, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), danach erfolgte die Injektion von 15 ml 1xPBS (*phosphate buffered saline*, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) innerhalb von ca. 3 Minuten, um vor der Perfusion mit PFA das Blut aus dem Gefäßsystem zu spülen. Das rechte Herzohr wurde mit einer Irisschere eröffnet, um den Blutaustritt zu ermöglichen. Danach wurden ebenfalls innerhalb von ca. 3 Minuten 15 ml 4 % PFA injiziert. Im Anschluss erfolgte die Entnahme von Augen und Gehirn.



Abbildung 14: Paraformaldehyd-Perfusion (PFA-Perfusion)

- 1 Arbeitsplatz zur PFA-Perfusion unter Abzug (an P11 u. 21 gleich)
- 2 Tier auf dem Rücken liegend an den Extremitäten auf Styroporplatte fixiert (Tier P11)
- 3 Eröffnung der Haut zwischen Oberrand des Sternums bis zum Bauchnabel (Tier P11)
- 4 Eröffnen des Bauchraumes und des Thorax (Tier P11)
- 5 Eröffneter Thorax mit Herz (Tier P21)
- 6 Herz vor Punktion (Tier P11)
- 7 Punktion der linken Herzkammer (Tier P21)
- 8 Ausströmen des Blutes und des Puffers nach Eröffnen des rechten Herzohres (Tier P21)

Ansatz für Paraformaldehyd-Lösung (PFA)

Das PFA wurde angesetzt, indem Aqua bidestillatus auf +60 °C erwärmt und 2 Tabletten Natriumhydroxid (NaOH) hinzugegeben wurden. In erwärmtem Wasser wurden 80 g PFA gelöst und 38 ml monobasisches 1 M Natrium-Phosphat (M = Molaremasse, 1M = Molekulargewicht in Gramm je Liter) und 162 ml dibasisches 1 M Natrium-Phosphat hinzugefügt. Der nächste Schritt bestand in der Bestimmung des pH-Werts, der zwischen 7,3 und 7,4 liegen sollte. Mit Reinstwasser Typ 1 wurde auf 2 Liter Volumen aufgefüllt, die Flüssigkeit wurde filtriert und auf 4 °C abgekühlt.

Ansatz Natrium-Phosphat-Lösung

Für die monobasische 1M Natrium-Phosphat-Lösung wurden 137,99 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ gewogen und mit Reinstwasser Typ 1 auf 800 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde dann auf 7,3 bis 7,4 eingestellt und auf einen Liter ergänzt.

Zur Herstellung der dibasischen 1 M Natrium-Phosphat-Lösung wurden 141,96 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ gewogen und mit Reinstwasser Typ 1 auf 800 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde dann auf 7,3 bis 7,4 eingestellt und es ebenfalls wurde auf einen Liter aufgefüllt.

Tabelle 7: Chemikalien zur Herstellung von Lösungen

Produkt	Hersteller
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	Merck, Darmstadt, Deutschland
$\text{NaHPO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBST-Lösung	1xPBS, 0,1 % Triton X-100 und 1 % Ziegen serum

2.5 Gehirnentnahme und –präparation

Gehirnentnahme und –präparation für Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurde nach PBS- und PFA-Perfusion der Kopf abgetrennt. Es erfolgte die Entnahme der Augen durch die Gießener Arbeitsgruppe. Im Anschluss wurde mit einem Skalpell die Haut des Kopfes mittig von rostral nach dorsal eröffnet und mit einer feinen Schere wurde vom *Foramen magnum* ausgehend die *Sutura sagittalis* durchtrennt. Die Schädelhälften wurden im rechten Winkel zur *Sutura sagittalis* erneut eingeschnitten und zu den Seiten weggeklappt, das Gehirn dann mit einem Rührspatel angehoben und stumpf vom Rückenmark getrennt. Das entnommene Gehirn wurde in PFA-gefüllte, beschriftete Schraubgläser verbracht.

Gehirnentnahme und –präparation für Molekularbiologie

Für molekularbiologische Fragestellungen erfolgte nach der zervikalen Dislokation an P7, P11 und P21 die Entnahme der Augen durch die Gießener Arbeitsgruppe. Die Gehirnentnahme erfolgte analog zur Entnahme für die Histologie (siehe Kapitel 2.5 Gehirnentnahme und –präparation). Die folgenden Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen:

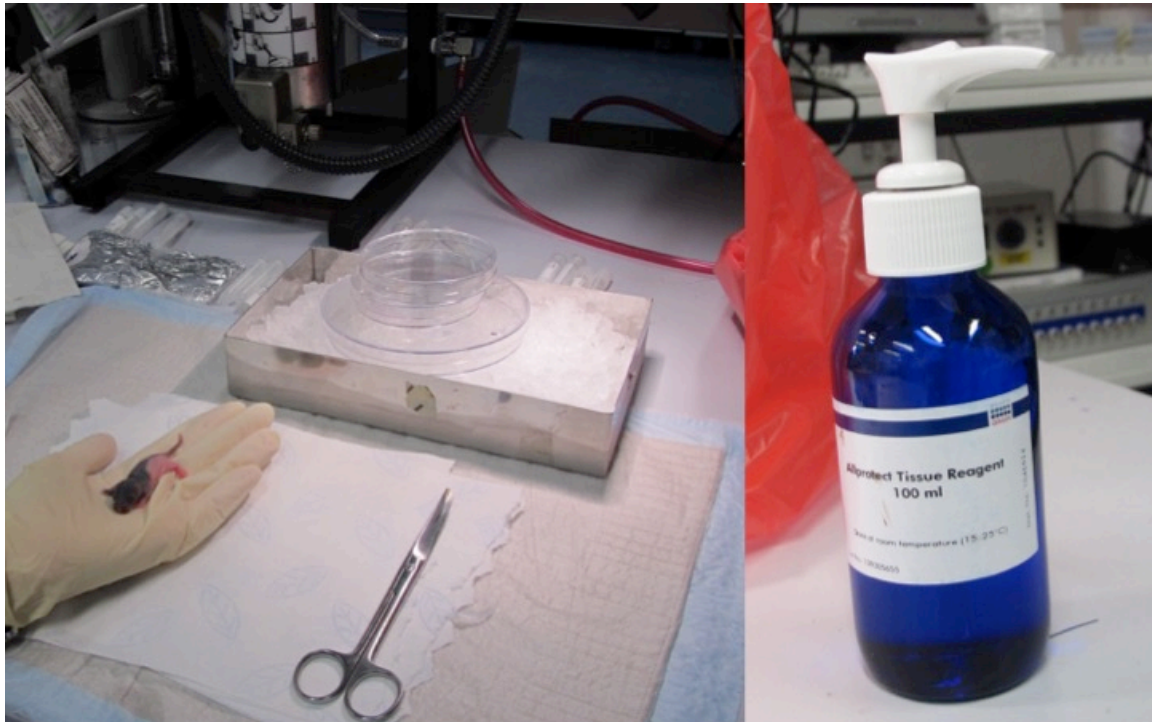


Abbildung 15: Gewinnung molekularbiologische Proben an P7

In einer Petrischale auf Eis wurde das Kleinhirn entfernt und danach wurden die Hemisphären des Gehirns getrennt. Die Gehirnhälften wurden in einzelne Stücke zerkleinert und in Kryo-Röhrchen gefüllt (zur Kryokonservierung von Geweben geeignete Gefäße). Darin befand sich Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland), das der Konservierung der DNA und RNA diente. Es sollte das Gewebe komplett umfließen.

2.6 Gehirnkonservierung und -lagerung

Histologie

Das der Konservierung der Gehirne dienende PFA wurde nach 24 Stunden Lagerung im Kühlschrank entfernt. Die Gehirne wurden in 30 %-Sucrose-Lösung weiter im Kühlschrank bei +4 °C aufbewahrt. Die Sucrose wurde in den nächsten Tagen zweimal gewechselt.

Ansatz Sucrose-Lösung

Zur Herstellung der 30 %-Sucrose-Lösung wurde 30 g Sucrose auf einer Waage in einem Messzylinder abgewogen und auf 100 ml mit 1xPBS aufgefüllt. Nach guter Vermischung klärte sich die Flüssigkeit wieder und wurde bei +4 °C im Kühlschrank gelagert.

Molekularbiologie

Die in Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Hilden, Deutschland) konservierten Proben wurden über Nacht bei +4 °C gelagert und am Folgetag wurde der Überschuss des Reagenz entfernt. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.7 Histologische Methoden

2.7.1 Herstellung von Schnitten

Als erster Schritt wurden die Gehirne aus der Sucrose entfernt und in ein Becherglas gelegt, das mit Solidofix-Kältespray (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefüllt war. Mit einem Tropfen Kleber Tissue Tek (Sakura, Staufen, Deutschland) wurde das Gehirn auf die Halterung (Stempel) des Gefrierschneidegerätes (Kryostat, CM1900 Firma Leica, Wetzlar, Deutschland) aufgefroren.

Jeweils 10 Objektträger (Superfrost plus, Firma Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden beschriftet und vorbereitet. Die Gehirne wurden bei -25 ° bis -26 °C von rostral nach dorsal in 15 bis 16 µm dicke Scheiben geschnitten. Ab dem Erscheinen des Hippocampus begann die für den Versuch interessante Region. Die koronar geschnittenen Gehirnscheiben wurden auf die Objektträger aufgenommen, bis auf jedem ca. 8 Scheiben hafteten. Auf dem ersten Objektträger lag Scheibe 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61 usw., auf dem zweiten Objektträger die Scheibe 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62. Durch dieses System waren auf jedem Objektträger verschiedene Gehirnregionen repräsentiert. Diese wurden bis zur Färbung bei -20 °C aufbewahrt.

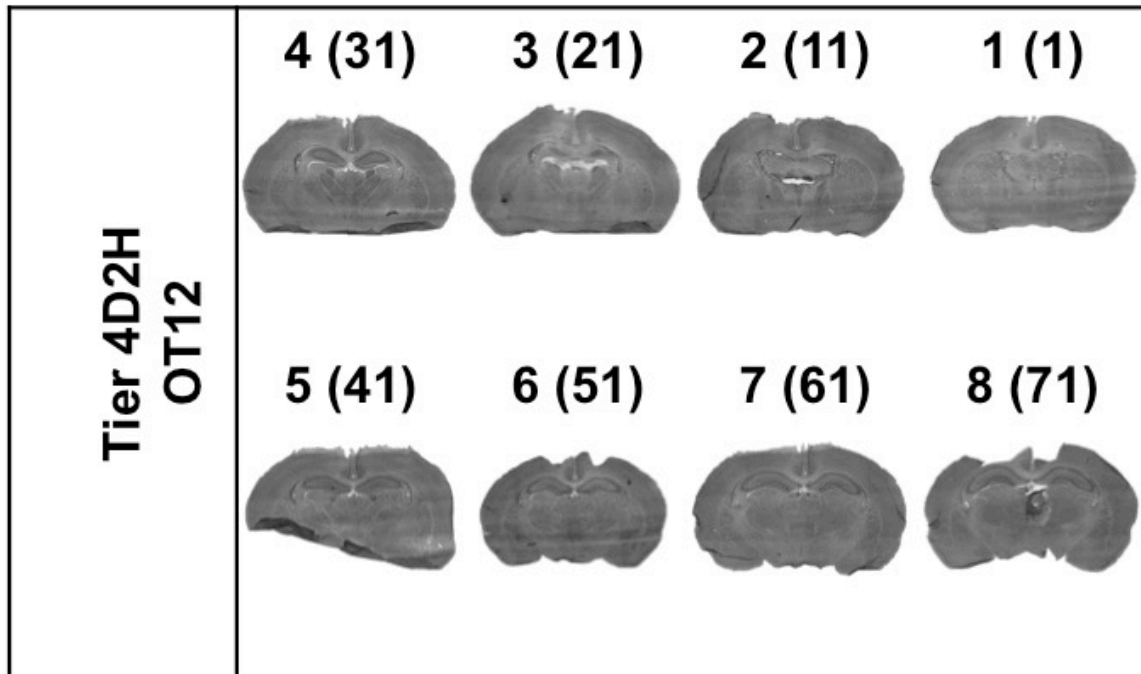


Abbildung 16: Nativer Objektträger (Gehirnscheiben in Weiß- und Grautönen)
 Tier aus der Kontrollgruppe

2.7.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um einen Überblick über die Regionen im Gehirn zu erhalten, wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Gefrierschnitte zunächst in Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 3 bis 5 Minuten eingelegt. Danach erfolgte das „Bläuen“ unter fließendem Leitungswasser für 10 bis 15 Minuten. In Folge wurde 3 bis 5 Minuten in 1 % Eosin G (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Vorher wurde Eosin 1 % in Wasser angesetzt und vor Gebrauch einige Tropfen Eisessig (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Im nächsten Schritt wurde eine Entwässerung mit zweimal 70 % Ethanol für ca. 30 Sekunden durchgeführt, dann mit zweimal 96 % Ethanol für 3 Minuten, im Anschluss mit zweimal 100 % Ethanol über 3 Minuten und zuletzt mit zweimal Xylol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) über 3 Minuten. Zum Abschluss wurde der Objektträger mit den Schnitten mit Corbit-Balsam (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) eingedeckt.

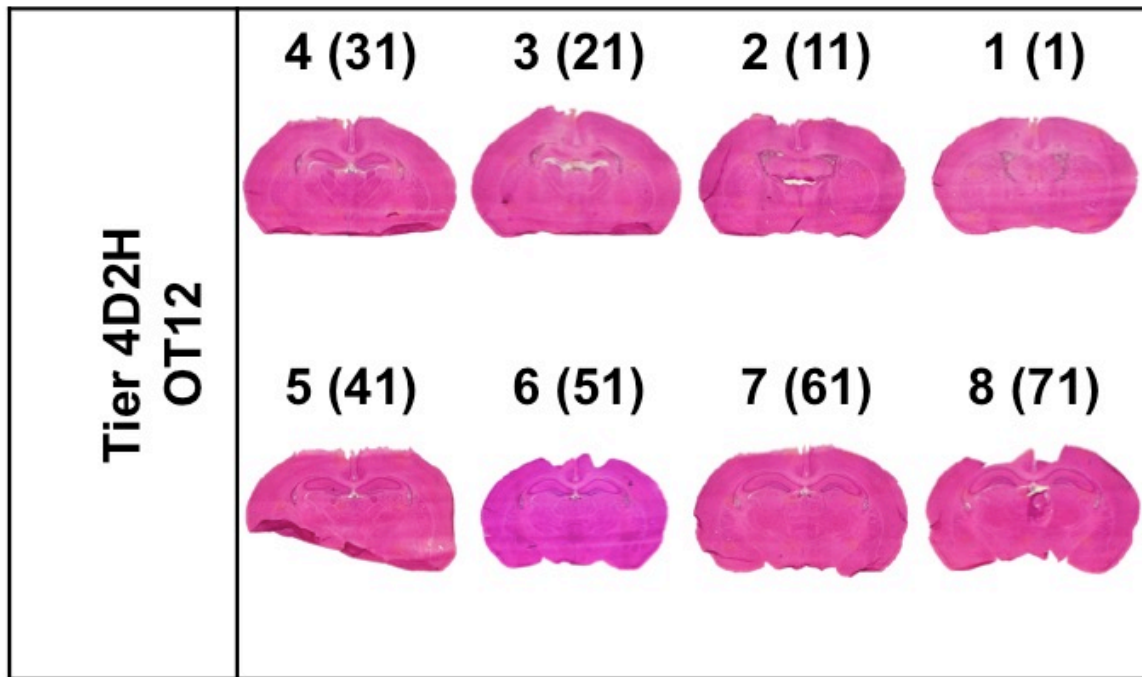


Abbildung 17: HE-Färbung (Gehirnscheiben in Rosa- und Lilatönen)
Tier aus der Kontrollgruppe

2.7.3 Myelin-Basis-Protein-Färbung (MBP-Färbung)

Für diese immunhistochemische Färbung wurden die Objektträger ca. 30 Minuten auf einer Heizplatte bei +30 °C getrocknet und anschließend mit 1xPBS gespült. Mit einem Fettstift (Dako Cytomation Pen, Dako, Hamburg, Deutschland) wurden die Gehirnscheiben gemeinsam umfahren und eine Gehirnscheibe separat als Kontrolle umrundet. Dieser Schritt sollte die später aufgebrachte Flüssigkeit auf dem Glas des Objektträgers halten. Für alle Scheiben auf einem Objektträger folgte bei Raumtemperatur eine zweistündige Blockierung der unspezifischen Bindungen mit 1xPBS-Lösung, die 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 5 % Ziegenerum (PAA/ GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) enthielt. Der monoklonale Primär-Antikörper Sternberger Monoclonal Antibodies-99 (SMI-99) gegen MBP (Covance, München, Deutschland) wurde 1:500 verdünnt in PBST-Lösung (1xPBS, 0,1 % Triton X-100 und 1 % Ziegenerum) und auf die Gehirn-Schnitte pipettiert, die Objektträger wurden über Nacht bei +4 °C in einem Gefäß mit angefeuchteter Luft inkubiert. Der einzeln umrundete Schnitt wurde nicht mit Primär-Antikörper bedeckt, er diente als Negativ-Kontrolle. Am nächsten Tag wurden die Objektträger kurz abgespült und dann einmal 5 Minuten und dreimal 10 Minuten mit 1xPBS auf der Schüttelplatte gewaschen. Im Anschluss erfolgte

die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dabei handelte es sich um einen Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper Alex Fluor 488 (Life technologies, Darmstadt, Deutschland), der 1:800 in PBST mit 1 % Ziegenserum verdünnt war. Als nächstes wurde nochmal kurz abgespült und einmal 5 Minuten und dreimal 10 Minuten mit 1xPBS auf der Schwenkplatte gewaschen. Zuletzt erfolgte zum Sichtbarmachen der Zellkerne die DAPI-Färbung (4',6-Diamidin-2-phenylindol (Roth, Melsungen, Deutschland), 0,2 µg/ml aus Stocklösung 1mg/ ml in Wasser, verdünnen 1:500 in 1xPBS) für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der Objektträger wurde abgespült und die Reste in den Sondermüll entsorgt. Im Anschluss erneutes Waschen des Objektträgers mit 1xPBS für zweimal 10 Minuten auf der Schwenkplatte. Das Deckglas des Objektträgers wurde mit 2 Tropfen FlouromountG (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) fixiert und im Dunkeln bei +4 °C mindestens 2 Stunden zum Trocknen gelegt.

Tabelle 8: Substanzen für die histologischen Färbungen der Hirnschnitte

Produkt	Hersteller
Corbit Balsam	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eosin G	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoromount Medium	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS 10x	PAA/ GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland
Solidofix-Kältespray	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tissue Tek	Sakura, Staufen, Deutschland
Triton X-100 reinst.	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ziegen-Serum	PAA/ GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland

Tabelle 9: Herstellung der Block- und Inkubationslösungen für Gefrierschnitte und -färbungen

	Rezept Blocklösung	Rezept Inkubationslösung
1xPBS	ad nml	ad nml
Triton X-100	0,1 %	0,1 %
Ziegenerum	5 %	1 %

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für immunhistologische Färbungen des Gehirns

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IgG	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Roth, Melsungen, Deutschland
Sternberger Monoclonal Antibodies-99	Covance, München, Deutschland

2.7.4 Mikroskopieren der HE-Färbung

Die periventrikuläre Region wurde nach HE-Färbung mit einem Biozero-Mikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) untersucht. Die betreffende Region wurde in den koronaren Schnitten aufgesucht, es wurden Teilaufnahmen gemacht und mit Hilfe der Software zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

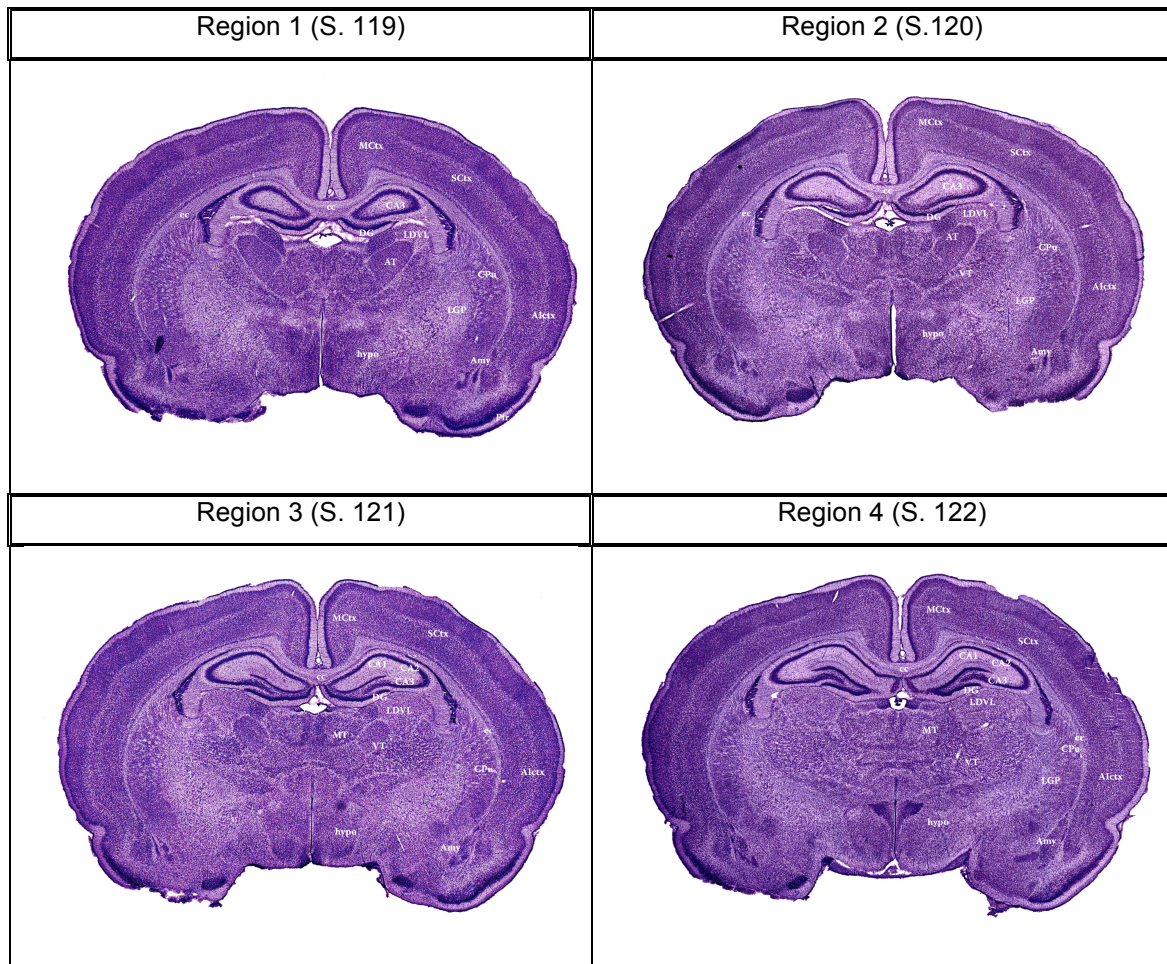


Abbildung 18: Bestimmung der korrekten Lokalisation

Beispiele modifiziert nach „Atlas of the Neonatal Rat Brain“ (Ramachandra & Subramanian, 2011) zur Hilfe der Bestimmung der korrekten Lokalisation

AICTx: Agranuläre Inselrinde

Amy: Kerne des Amygdala

AT: Anteriorer Thalamus

CA1: Feld CA1 des Hippocampus

CA2: Feld CA2 des Hippocampus

CA3: Feld CA3 des Hippocampus

cc: *Corpus callosum*

CPu: Caudate-Putamen-Region

DG: *Gyrus dentatus*

ec: *Capsula externa*

hypo: *Hypothalamus*

LDVL: Lateraler dorsoventraler Thalamus

LGP: Lateraler Globus pallidus

MCtx: Motorischer Kortex

MT: Medialer Thalamus

pir: *Cortex piriformis*

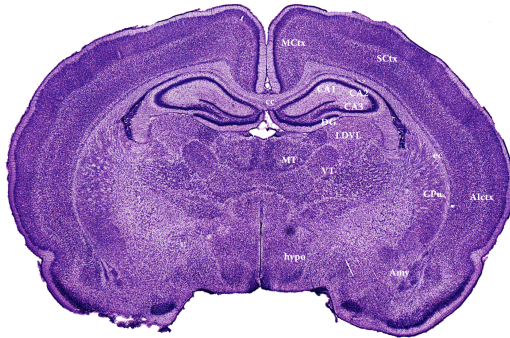
SCtx: Somatosensorischer Kortex

VT: Ventraler Thalamus

Kriterien für die Auswahl der gewünschten Region:

Region 3 (S. 121)

Eigenes Bild:



- Hippocampus kommaförmig
- Ausbreitung des Ventrikels
- *Gyrus dentatus*
- *Stria medullaris thalamus*

Abbildung 19: Kriterien für Auswahl der korrekten Region in HE-Färbung

Bild links aus „Atlas of the Neonatal Rat Brain“ (Ramachandra & Subramanian, 2011)

Unter Anwendung der oben genannten Kriterien ist Region 3 (*Atlas of the Neonatal Rat Brain* S. 121) der korrekte koronare Schnitt.

2.7.5 Mikroskopieren der MBP-Färbung

Die MBP-Färbung wurde mit dem 20-er-Objektiv und dem GFP-Filter (*Green-Fluorescent-Protein-Filter*) eines Observer Z1 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Die Navigation erfolgte vom Interhemisphärenspalt aus zum *Corpus callosum*, von dort aus zu einer dreieckigen Struktur der *Capsula externa* oberhalb des Feldes 3 des Hippocampus.

Die Abbildung 20 zeigt die entsprechende Region:

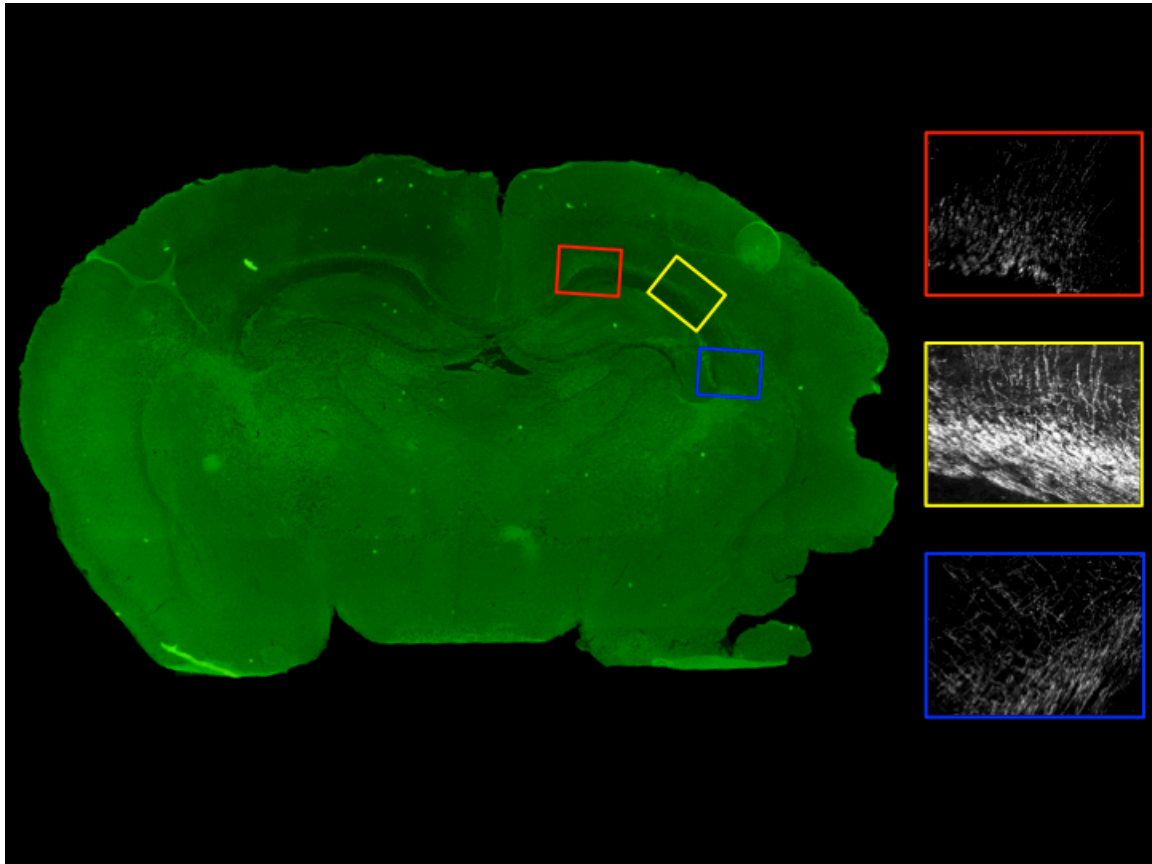


Abbildung 20: MBP-Färbung

Komplette koronare Gehirnscheibe (8-fache Vergrößerung), in den Einschüben MBP der jeweiligen Region in 20-facher Vergrößerung; dreieckige Struktur (roter Kasten) und auch 2 Bildausschnitte weiter lateral gelegene Region (gelber Kasten) sowie Ausläufer des Ventrikels (blauer Kasten) wurden fotografiert (je linke und rechte Hemisphäre); MBP wandert von der periventrikulär gelegenen Kapsel in Richtung Kortex aus

Darstellung zur Auswertung der Bilder

Pro Tier wurden 3 zusammengehörige Fotos (rechte und linke Gehirnhälfte) ausgewählt und zur Auswertung per MBP-Score vorbereitet. Alle Fotos wurden verblindet, d.h. die Gruppenzugehörigkeit wurde unkenntlich gemacht.

Auswertung HE- und MBP-Färbung

Die HE-Färbung wurde zur präzisen Lokalisation der gewünschten Region genutzt. Der äquivalente Schnitt wurde in der MBP-Färbung auf Vollständigkeit und gute Signalstärke der Fluoreszenz-Färbung überprüft.

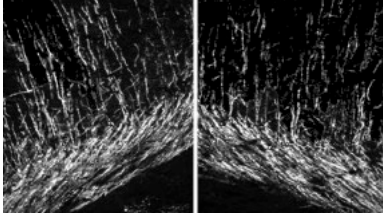
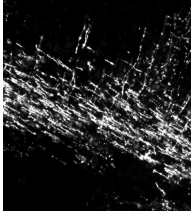
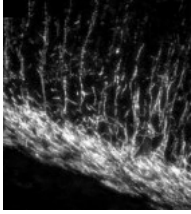
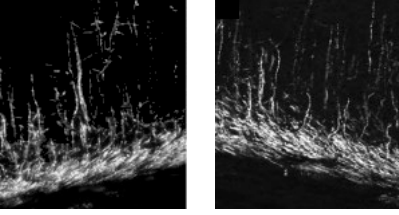
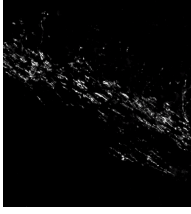
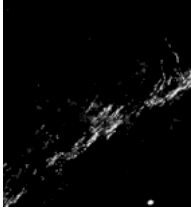

Insgesamt wurden 31 Tiere zur Auswertung herangezogen. Pro Tier wurden je 3 Bilder jeweils der linken und rechten Seite ausgewertet, d.h. es wurden insgesamt 186 Bilder bewertet.

2.7.6 MBP-Score

Follett et al. beschrieben als erste einen Score zur Beurteilung des MBP, der 3 Grade der Schädigung unterschied (Follett et al., 2000). Dieser Score wurde von Gerstner et al. auf 5 Schädigungsgrade erweitert (Gerstner et al., 2008).

Die verblindeten 93 Paare des hier beschriebenen Versuches bewertete B. Reich (geb. Gerstner) mit Hilfe ihres MBP-Scores mit den Bewertungen 0 bis 5 (Gerstner et al., 2009). Die Bewertung 6 wurde als zusätzliche Kategorie eingeführt, da es im vorliegenden Versuch mehr Infarkte gab als in den bereits durch andere Arbeitsgruppen durchgeführten Versuchen.

Tabelle 11: Score für MBP-Färbung modifiziert nach Gerstner

<p>0: Keine Veränderung (Gerstner et al., 2009)</p>	
<p>1: Leichter Substanzverlust (eigenes Bild)</p>	
<p>2: Leichter Substanzverlust; keine Beteiligung der Kapsel (Gerstner et al., 2009)</p>	
<p>3: Substanzverlust, Fragmentierung oder Ausdünnung der Kapsel (Gerstner et al., 2009)</p>	
<p>4: Zerklüftete Kapsel; Ausdünnung der Kapsel aber kein kompletter Verlust (eigenes Bild)</p>	
<p>5: Unterbrechung der Kapsel durch vermehrte Ausdünnung; in Teilbereichen kompletter Verlust der Kapsel (Gerstner et al., 2009)</p>	
<p>6: Infarkt (eigenes Bild)</p>	

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Homogenisation des Gehirngewebes

Für die Homogenisation des Gehirngewebes wurde der Homogenisator gentleMACS (Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) genutzt. Unter dem Abzug wurde die entsprechende Menge des RLT-Puffer (600 µl RLT-Puffer pro 30 mg Gewebe) zu den Gehirnhälften hinzugegeben und die gentleMACS-M-Röhrchen (Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) sofort weiter auf Eis aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Proben in ihren gentleMACS-M-Röhrchen in den Homogenisator gentleMACS gestellt, das RNA-Programm 1 gestartet. Dabei rotierten die Messer für ca. 1 Minute und zerkleinerten das Gewebe. Anschließend wurden die Proben in ihren Röhrchen sofort wieder in Eis gelagert, bevor sie für 4 Minuten bei 2350 rpm zentrifugiert und danach in ein 15 ml Falcon-Röhrchen dekantiert wurden. Zur späteren RNA- oder DNA- oder Protein-Isolierung wurden 600 µl Lysat in ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Die weitere Lagerung des gewonnen Homogenisats erfolgte bei -80 °C.

2.8.2 RNA-Extraktion

Die Lysate wurden aufgetaut und für 3 Minuten bei *full speed* (13.000 rpm) zentrifugiert. Für die folgenden Schritte wurde das AllPrep DNA/ RNA/ Protein Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Vorsichtig wurde der Überstand mittels Pipette auf eine DNA-Säule überführt, die in einem 2-ml-Röhrchen stand. Im Anschluss erfolgte erneutes Zentrifugieren bei *full speed* für 1 Minute. Im Überstand befanden sich RNA und Protein und die DNA auf der Säule, die dann auf ein neues 2-ml-Röhrchen gestellt wurde. Die DNA-Isolierung erfolgte am gleichen Tag. Bis dahin wurde sie bei +4 °C gelagert. Der Überstand mit RNA und Protein wurde mit 430 µl Ethanol 96 bis 100 % gut vermischt. Von dieser Menge wurden 450 µl auf eine RNA-Säule auf einem 2-ml-Röhrchen pipettiert, die dann 15 Sekunden bei *full speed* zentrifugiert wurde. Nun befand sich die RNA auf der Säule und das Protein im Durchfluss, welches als nächstes in ein neues 2-ml-Eppendorf-Röhrchen pipettiert wurde. Im Anschluss wurde die RNA-Säule auf ein 2-ml-Röhrchen gesetzt und die restlichen 450 µl des Durchflusses auf die RNA-Säule gegeben. Es fand eine erneute Zentrifugation bei *full speed* für 15 Sekunden statt. Der entstandene Durchfluss wurde dem

schon teilweise mit Protein gefüllten 2-ml-Eppendorf-Röhrchen hinzugefügt, das bei +4 °C zur Protein-Reinigung lagerte. Nun wurde zur RNA-Isolierung die RNA-Säule wieder auf das 2-ml-Röhrchen gesetzt und die Säule mit 700 µl RW1-Puffer benetzt und bei *full speed* für 15 Sekunden in der Zentrifuge gereinigt. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Reinigungsvorgang wurde nun mit 500 µl RPE-Puffer statt RW1-Puffer wiederholt, wobei der Durchfluss auch verworfen wurde. 500 µl RPE-Puffer wurden hinzugefügt und bei *full speed* für 2 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde der Durchfluss entsorgt. Zum Trocknen wurde die RNA-Säule wieder auf ein neues 2-ml-Röhrchen gesetzt und für 1 Minute bei *full speed* zentrifugiert. Als nächstes wurde die RNA-Säule auf ein 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen befördert, mit 30 µl Ribonuklease-(RNase)-freiem Wasser befeuchtet und erneut bei *full speed* für 1 Minute zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte der DNase-I-Verdau (Verdau durch Desoxyribonuklease I) mittels Materialien der Firma Invitrogen (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland). Dafür wurde zur isolierten RNA folgendes hinzugefügt: 1 µl 10x DNase I Reaction Buffer und 1 µl DNase. Danach wurde die Mischung 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Zeit 2 µl Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugefügt. Die Probe wurde auf +65 °C für 10 Minuten erwärmt und entweder auf Eis zwischengelagert oder bei -80 °C eingefroren. Die Messung der Konzentration der RNA erfolgte mittels Photometer (Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) bei 260 nm.

2.8.3 RNA-Qualitätsnachweis

Die Beurteilung der RNA-Qualität erfolgte über eine Gel-Elektrophorese. Für die Elektrophorese wurde ein Agarosegel hergestellt, indem in einem 250-ml-Erlenmeyer-Kolben 1,2 g Agarose abgewogen und 81 ml Reinstwasser Typ 1 hinzugefügt wurden. Die Mischung wurde dann in der Mikrowelle ca. 2 Minuten aufgekocht bis eine klare Lösung entstand, wobei es wichtig war, den Kolben zwischendurch mehrmals zu schwenken, da es sonst zu einem Siedeverzug kommen kann. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. +60 °C wurde 10 ml MOPS-Puffer sowie 5,8 ml Formaldehyd 37 % hinzugegeben. Diese und die anschließenden Tätigkeiten erfolgten unter dem Abzug. Damit möglichst keine Luftblasen entstanden, wurde die Lösung anschließend leicht geschwenkt.

In die Gelkammer wurde der entsprechende Kamm eingesetzt und im Anschluss das Gel in eine dafür vorgesehene Kammer gegossen. Beim Gießen entstandene Luftblasen konnten dann entfernt werden. In der Elektrophorese-Kammer wurde das Agarosegel vorsichtig mit 1xMOPS-Laufpuffer bedeckt. Nun wurde der Kamm entfernt. In die Probenaschen wurden die entsprechenden Proben eingefüllt, wobei verhindert wurde, dass Proben in andere Taschen übertraten. Während der Untersuchung liefen die zu testende RNA und eine Vergleichsprobe (kb DNA ladder) unter Einwirkung von elektrischem Strom je nach Größe unterschiedlich schnell durch das Gelbett. So entstanden 2 mehr oder weniger dicke Banden. Die Qualität der Proben wurde durch eindeutig abgrenzbare Banden an bestimmten Orten auf der Ladder ermittelt. Die Dicke der Banden gab Informationen über die Quantität der RNA. Waren die Banden uneinheitlich verteilt auf der gesamten Gelstrecke, war davon auszugehen, dass die RNA-Proben stark degradiert waren.

Die 1kb DNA Ladder (für RNA-Gel) wurde erstellt aus 100 µl 1kb Ladder 1 µg/µl (Life technologies, Darmstadt, Deutschland) sowie 200 µl 6x DNA-Probenpuffer und 900 µl Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) pH 8,0. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C.

Ansatz MOPS-Puffer

Der 10x MOPS-Puffer setzte sich aus 21 g MOPS (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 2,05 g Natriumacetat wasserfrei (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 ml 0,5M EDTA mit 400 ml Reinstwasser zusammen. Er wurde auf den pH 7 mit NaOH eingestellt und 500 ml Reinstwasser hinzugegeben.

TE-Puffer

Der TE-Puffer für DNA-Ladder setzte sich aus 1 ml 1M Tris (Trishydroxymethyl-aminomethan)) pH 8,0 und 200 µl 0,5M EDTA pH 8,0 zusammen. Danach wurden 100 ml Reinstwasser hinzugegeben und der Puffer autoklaviert.

Für das 1M Tris pH 8,0 wurden 60,55 g Tris Base (ACROS, Berlin, Deutschland) und 800 ml DEPC-H₂O (Diethyl Pyrocarbonate Wasser) vermischt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Mit Salzsäure (HCl) wurde der pH auf 8 eingestellt und mit einem Liter DEPC-H₂O ergänzt. Im Anschluss wurde die Lösung autoklaviert. Für das DEPC-H₂O wurden 500 ml Reinstwasser und 500 µl DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) vermischt und kräftig geschüttelt. Am nächsten Morgen erfolgte das Autoklavieren.

Tabelle 12: Chemikalien zur Herstellung von Puffern

Produkt	Hersteller
Bromphenolblau	Riedel-de-Häen, Seelze, Deutschland
DEPC	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma, München, Deutschland
Essigsäure	ACROS, Berlin, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaOH (Plättchen)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris Base	ACROS, Berlin, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.8.4 Reverse Transkription

Nach den MIQE-Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) wurden pro RNA jeweils 3 cDNAs umgeschrieben, um verlässliche und qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erreichen (Bustin et al., 2009).

Das SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde für die reverse Transkription genutzt und laut Protokoll des Herstellers verwendet. Es wurde 0,1 pg RNA in 500 ng cDNA umgewandelt und vor der Verwendung alle Komponenten vermischt und zentrifugiert. Der Thermoblock wurde auf +65 °C vorgeheizt. In einem 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen auf Eis wurden als RNA-Template-Mix 500 ng RNA (n/ µl), 1 µl Primer (50 ng/ µl *random hexamers*) sowie 1 µl Annealing Puffer und bis zu 8 µl RNase/ DNase-freies Wasser vermischt und bei +65 °C über 5 Minuten inkubiert. Sofort danach wurden die Proben für 1 Minute auf Eis platziert und nach kurzer Zentrifugation im Röhrchen gesammelt. Zu den vorhandenen Röhrchen auf Eis wurden folgende Substanzen ergänzt: 10 µl 2X First-Strand Reaction Mix und 2 µl SuperScript III/ RNaseOUT Enzyme Mix. Dann wurde die Probe mit dem Vortex-Gerät vermischt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 10 Minuten bei +25 °C und 50 Minuten bei +50 °C so-

wie die Beendigung der Reaktionen bei +85 °C über 5 Minuten und die anschließende Kühlung auf Eis. Falls nicht sofort danach die qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) erfolgte, wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

2.8.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Vorbereitungen für die qPCR wurden nach den MIQE-Guidelines durchgeführt, um qualitativ hochwertige und verlässliche qPCR-Ergebnisse zu erhalten (Bustin et al., 2009).

Die 5 Wiederholungen des Versuches zwischen November 2011 und Oktober 2013 werden im Folgenden als Durchgänge bezeichnet. Auf diesem Wege entstanden pro Versuchsdurchgang 24 Proben, aus denen jeweils 3 cDNAs erstellt wurden. Somit entstanden insgesamt 72 Proben. Für alle Proben wurden mit 6 ausgewählten Genen (HIF-1 α , VEGF-A164, Epo-R, TNF α , NOS-2, HPRT) 2 qPCR-Durchläufe gemacht, d.h. insgesamt 12 qPCR-Läufe. Pro Gen, Gruppe und Zeitpunkt entstanden 30 CT-Werte (*cycle threshold* Werte), wobei die Werte der jeweils 3 cDNAs einer Gehirnhälfte gemittelt wurden. Daraus ergaben sich 10 Mittelwerte (5 Gehirnhälften in 2 qPCR-Läufen). Im Anschluss wurden die Mittelwerte einer Gehirnhälfte aus den beiden qPCR-Läufen gemittelt. Damit wurde pro Gehirnhälfte einer Gruppe ein Mittelwert berechnet und daraus ein End-CT-Wert ermittelt.

Die End-Produkte der qPCR wurden, um die Produktgröße zu überprüfen, auf ein Agarosegel aufgetragen.

Agarose-Gel

Das Agarose-Gel zur Überprüfung der End-Produkte der qPCR und ihrer Produktgröße wurde mit einer 100bp DNA Ladder ergänzt.

Protokoll für qPCR (quantitative polymerase chain reaction)

Auf dem qPCR-Cycler Rotorgene (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden die qPCR-Untersuchungen durchgeführt, zur Darstellung die dazugehörige Software benutzt.

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für qPCR

Reaktionsschritt		Temperatur	Dauer
Hot Start		94 °C	5 Min.
Denaturierung		94 °C	30 Sek.
35 Zyklen	Annealing VEGF-A164	66 °C	30 Sek.
	HIF-1α		
	Epo-R		
	TNFα		
	NOS-2		
	HPRT		
	Extension	72 °C	30 Sek.
	Extension	72 °C	5 Min.
Schmelzkurvenanalyse		Schrittweise Erhöhung um 0,4 °C/ Sek.	

Die qPCR wurde in Rotor-Gene-Strip-Röhrchen (Starlab) mit einem Probenansatz von jeweils 6 µl Mastermix und 500 ng (in 4 µl) cDNA durchgeführt. Kapa Sybrfast Universal (Peqlab) wurde als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, in der Substanz waren Polymerase, die dNTPs und der Puffer enthalten.

Tabelle 14: Ansatz 10 µl

Komponente		Menge
Mastermix	F-Primer (10pmol/ µl)	0,1 µl
	R-Primer (10pmol/ µl)	0,1 µl
	Kapa Sybrfast Universal	5 µl
	DEPC-H ₂ O	0,8 µl
cDNA	cDNA (125ng/ µl)	4 µl

Tabelle 15: Verwendete Enzyme und Marker für Genexpressionsanalyse

Produkt	Hersteller
AllPrep DNA/ RNA/ Protein Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNase I, Amp. Grade	Life technologies, Carlsbad, USA
Ladder 1 µg/ µl 100bp	Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Ladder 1 µg/ µl GIBCOBRL 1kb	Life technologies, Darmstadt, Deutschland
RNaseZAP	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SuperScript III First-Strand Synthesis Super-Mix	Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 16: Substanzen für RNA-Extraktion, Reverse Transkription, qPCR und Genotypisierung

Produkt	Hersteller
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Gel Red Nucleic Acid Stain 10.000x in H ₂ O	Biotium/ Biotrend, Köln, Deutschland
Kapa Sybrfast Universal	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Seakem LE Agarose	Lonza, Rockland ME, USA

2.8.6 Primer

Alle verwendeten Primer lieferte die Firma Metabion (Planegg, Deutschland)/ Eurofins (Hamburg, Deutschland) und wurden mit Reinstwasser Typ 1 zu einer Gebrauchskonzentration von 10 pmol/ µl verdünnt. Die Primersequenzen für TNFα und NOS-2 wurden aus Chidlow et al. übernommen (Chidlow et al., 2010). Alle übrigen Primer wurden mit Hilfe des Programms Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) selbst entworfen.

Tabelle 17: Verwendete Primersequenzen

Gen	Fragmentgröße	Primersequenz
Epo-R (<i>erythropoietin receptor</i>)	115 Basenpaare	Sense: CGGCTCCATGCGTTTCTGGTGT Antisense: ATGCGGTGGTAGCGAGGA-GATC
HIF-1 α (<i>hypoxia inducible factor 1, α subunit</i>)	180 Basenpaare	Sense: GCACCGATTGCGCATGGAGG Antisense: TCACGTTGTGGG-GAAGTGGC
HPRT (<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)	105 Basenpaare	Sense: TTGTTGGATATGCCCTTGACT Antisense: CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG
NOS-2 (<i>inducible nitric oxide synthase 2</i>)	225 Basenpaare	Sense: CTGGAGGTGCTGGAAGAGTT Antisense: CTTCGGGCTTCAGGTTATTG
TNF α (<i>tumor necrosis factor α</i>)	111 Basenpaare	Sense: AAATGGGCTCCCTCTCATCA-GTTC Antisense: TCTGCTTGGTGGTTT-GCTACGAC
VEGF-A164 (<i>vascular endothelial growth factor-A164</i>)	180 Basenpaare	Sense: ATGAACTTTCTGCTCTCTT-GGGTGC Antisense: ATTG-GACGGCAATAGCTGCGCT

A: Adenin
C: Cytosin
G: Guanin
T: Thymin

2.8.7 Berechnung des fold change mittels $\Delta\Delta CT$ Methode

Im Rahmen dieses Projektes wurde anhand einer Kontrollgruppe und eines Kontrollgens (*housekeeping gene*) eine Hoch- oder Herunterregulation eines Gens berechnet, das in allen Zellen in ungefähr gleicher Menge exprimiert wurde. Dies wird auch als relative Quantifizierung der Genprodukte bezeichnet.

Da die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) auch unter (zyklischer) Hyperoxie konstant exprimiert wird, wurde sie als *housekeeping gene* ausgesucht (Van Wijngaarden et al., 2007).

Durch die Berechnung des *fold change* (FC) mittels der wissenschaftlich anerkannten $\Delta\Delta CT$ -Methode wurde die relative Quantifizierung durchgeführt (Holzapfel & Wickert, 2007; Pfaffl, 2004). Die n-fache Hoch- bzw. Herunterregulation

lation eines Gens wird durch den FC ausgedrückt. Einer Hochregulation entsprechen Werte über 1 (unter Beachtung der logarithmischen Einheit des FC), Werte unter 1 einer Herunterregulation. Als sogenannte *baseline* oder Nulllinie diente der Wert 1, der aus Expression des *housekeeping genes* und der Genexpression der Kontrollgruppe ermittelt wurde.

Tabelle 18: Berechnung fold change

$\text{CT Zielgen} - \text{CT Referenzgen} = \Delta\text{CT}$ $\Delta\text{CT Intervention} - \Delta\text{CT Kontrolle} = \Delta\Delta\text{CT}$ $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$
--

2.8.8 Geschlechtsbestimmung

Aufgrund ihres jungen Alters wurde in diesem Projekt die Geschlechterbestimmung der Ratten durch eine PCR des SRY-Gen (*sex determining region of Y-gene*) durchgeführt (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993). Das SRY ist ein Gen, das auf dem Y-Chromosom liegt und bei Vorhandensein bestätigt, dass es sich bei diesem Tier um ein Männchen handelt (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993; Whitfield et al., 1993).

Zur Genotypisierung der Tiere wurden ihnen die Schwanzspitzen *post mortem* abgetrennt und in 75 µl Lysispuffer und 5 µl Proteinase K (10 mg/ ml) über Nacht bei +55 °C (min. 5 Stunden) geschüttelt. Der Lysispuffer bestand aus 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (8,5), 5 mM EDTA bei pH 8,0 und 0,2 % Sodium dodecylsulfat (SDS). Bei +95 °C wurden die Ansätze 5 Minuten erhitzt und zentrifugiert. Im Anschluss wurde eine 1:6 Verdünnung angesetzt, d.h. 50 µl des Überstandes und 250 µl Aqua bidestillatus. Mit 2 µl des verdünnten Überstandes wurde eine PCR angesetzt:

Tabelle 19: PCR-Ansatz

10x Puffer	2,5 µl
F + R Primer Vasopressin (10 µM)	2 µl / 2 µl
F + R Primer SRY (10 µM)	2,5 µl / 2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
Taq Polymerase	0,2 µl
DNA	2 µl
H ₂ O	8,8 µl
Summe	25 µl

Die PCR durchlief in ca. 38 Zyklen folgende Schritte: 5 Minuten initiale Denaturierung bei +94 °C, danach folgte bei gleicher Temperatur eine zyklische Denaturierung über 45 Sekunden. Als nächster Schritt erfolgte über 45 Sekunden bei +54 °C das Annealing und als letztes fand bei +72 °C über 45 Sekunden die Elongation statt.

Im Anschluss wurde das Gel vorbereitet. Es wurde 2 % Agarosegel verwendet, d.h. 2 g Agarose/ 100 ml mit 1xTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) und 10 µl GelRed. Dann wurden 10 µl des PCR-Produktes und 1,5 µl Probenpuffer pro Tasche pipettiert und bei 70–80 Volt laufen gelassen. Die Auswertung erfolgte per UV-Imager (Invitrogen E-Gel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Die 100bp DNA Ladder für die Geschlechtsbestimmung wurde bei +4 °C gelagert und aus 100 µl 100bp Ladder 1 µg/ µl (Invitrogen/ Life technologies, Darmstadt, Deutschland) sowie 150 µl 6x DNA-Probenpuffer und 750 µl TE pH 8,0 hergestellt.

Tabelle 20: Primer für Geschlechtsbestimmung

Sense SRY	5'-CATCGAAGGGTTAAAGTGCCA-3'
Antisense SRY:	5'-ATAGTGTGTAGGTTGTTGTCC-3'
Erwartete Größe des Produktes:	104 bp
Sense Vasopressin:	5'-TGAGAACGGGTAAACTGGG-3'
Antisense Vasopressin	5'-GGGACATACTCCGCTCAGAC-3'
Erwartete Größe des Produktes	228 bp

Als Kontrolle diente das Vasopressin, das mit einer Bande bei 228 bp anzeigt, dass die Untersuchung funktioniert hat.

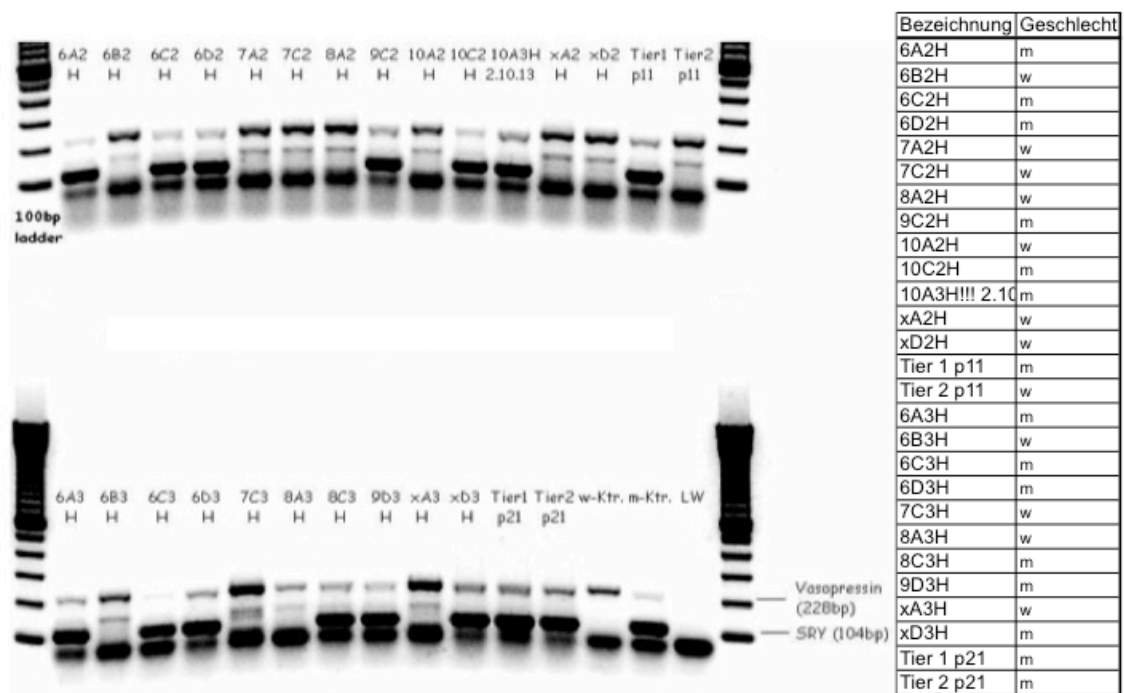


Abbildung 21: Beispiel Genotypisierung

Gel-Bild zur Genotypisierung mit SRY-Gen und Vasopressin, sowie Tabelle mit Nummern des Gel-Bildes und dazugehörigen Bezeichnungen der Tiere; Bsp. 6A2H: 6: 6. Versuchsrunde, A: Gruppe A, 2: Tier von p11, H: Histologie
bp: Basenpaare

2.9 Materialien (Tabellarische Auflistung)

2.9.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Allprotect Tissue Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
Barrier Facemask	Mölnlycke Healthcare, Göteborg, Schweden
BD Microlance 3 Kanülen Nr. 1 (20G), gelb	Becton Dickson, Madrid, Spanien
BD Plastipak 1 ml	Becton Dickson, Madrid, Spanien
Chirurgische Einmalskalpelle Cutifix	Braun, Melsungen, Deutschland
Dako Cytomation Pen für Gefrierschnitte	Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deluxe High Temperature Cautery Kit	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Diet Gel Boost Gelwasser	Clear H2O, Westbrook, USA
Drawing Inks Tusche	Hardtmuth, České Budějovice, Tschechien
Einmalspritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ES Kompressen 5x5 cm	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Ethanol 70 %	eigene Verdünnung
Foliodrape 45x75 cm	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Gasflasche 6 % Sauerstoff	Linde, Pullach, Deutschland
Gasflasche 80 % Sauerstoff	Linde, Pullach, Deutschland
gentleMACS-M-Tubes	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Hudson RCI, Aquapak	Teleflex, Athlone, Irland
Kalt-/ Warm-Kompresse	Söhngen, Taunusstein, Deutschland
Leukoplast 1 cm	BSN Medical, Hamburg, Deutschland
Lumocolor permanent compact 342	Staedtler, Nürnberg, Deutschland
Mircozid Sensitive Wipes	Schülke, Norderstedt, Deutschland
Mikrotom-Klingen	Leica, Wetzlar, Deutschland
Minispikes Filter	Braun, Melsungen, Deutschland
MoliNea Plus D 60x90cm	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Multifly Kanülenset	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Neolus 20 G Kanülen	Terumo, Leuven, Belgien
Nitril Untersuchungshandschuhe S, M, L	Nobaglove, Wetter, Deutschland
Omnifix Luer Lock 10 ml Einmalspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
PCR TW Tube 0,2 ml	Starlab, Hamburg, Deutschland
Prolene 5-0 Ethicon	Johnson & Johnson Medical GmbH Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Reagiergefäß 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäß 2.0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rotor Gene Strip Tube	Starlab, Hamburg, Deutschland
Sterican Kanülen 30 G x 1/2", gelb	Braun, Melsungen, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Vasco OP Protect Handschuhe	Braun, Melsungen, Deutschland
Vaseline Album	Facron, Barsbüttel, Deutschland
Vlies-Kittel	Medical Care & Serve Industry, Willich, Deutschland
Wattestäbchen Assistent	Karl Hecht AG, Sondheim, Deutschland

2.9.2 Geräte

Tabelle 22: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Aesculap Schere	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Arium 611 DI Reinstwasser-Anlage	TKA-GenPure, Niederelbert, Deutschland
Autoklav Typ 3870 ELV	Systec, Wettenberg, Deutschland
Binokular SMZ 168	Motic, Wetzlar, Deutschland
Biozero II Analyzer Software	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Biozero II Viewer Software	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Dumont #5 Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Dumont #55 Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine Scotsman, Berlin	Scotsman, Berlin, Deutschland
Elektrophorese Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien,
Eppendorf Pipette	Eppendorf, Wesseling/ Berzdorf, Deutschland
Fine Iris Scissors	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Biozero	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland
Funduskop (Micron III)	Phoenix Research Laboratories, USA
Gelkammer	OWL Separation System, USA
Gewebehomogenisator gentle MACS Dissociator	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Hardened Fine Iris Scissors	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Heizmatte Terratep	JBL GmbH & Co.KG, Neuhofen, Deutschland
Hypoxie-Einrichtung	eigene Herstellung
Isocage	Tecniplast, Casale Litta, Italien
Isofluran Verdampfer	Dräger, Lübeck, Deutschland
Kryostat Leica CM1900	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Labcycler sensoquest	Sensoquest, Göttingen, Deutschland

Laborwaage	Ohaus, Greifensee, Schweiz
Laborwecker	Dostmann, Wertheim, Deutschland
Lichtquelle Schott KL 1500 LCD	Schott, Mainz, Deutschland
LuftSauerstoffgerät Gox	Greisinger Electronic, Regenstauf, Deutschland
Magnetrührer Heidolph 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mono Channel Rodent Thermometer	Bioseb, Pinellas Park, USA
Moticam 1 Binokularkamera	Motic, Wetzlar, Deutschland
Nadelhalter Halsey with Tungston Carbide Jaws	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Neoblock	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Vector NTI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Observer Z1 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR-Cycler Rotorgene 2000	Qiagen, Hilden, Deutschland
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Photometer	Amersham Bioscience, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Pinzette Bonn 45°	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pinzette Bonn 7cm	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Rotlichtlampe IR808	Efbe, Bad Blankenburg, Deutschland
Schott KL 500 electronic Lichtquelle	Schott, Mainz, Deutschland
Software <i>syngo</i> MR B15	Siemens, München, Deutschland
Streampix Software	Norpix, Montreal, Kanada
Thermomix 5436	Eppendorf, Wesseling/Berzdorf, Deutschland
UV-Imager	Invitrogen E-Gel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vannas Spring Scissors - 3mm Blades	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Waage Ohaus	Ohaus, Greifensee, Schweiz
Wipptisch WT17	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zeiss Stemi 2000	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zilien- und Fadenpinzette	Geude, Heidelberg, Deutschland

2.10 Statistik

Die biometrische Planung des Versuches und die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgten in enger Abstimmung mit Herrn B. Greene vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg.

Der Versuch basiert auf einem zweifaktoriellen Design, der erste zu untersuchende Faktor war das Vorliegen von Ischämie + Hypoxie (Karotisligatur links und 8 % Sauerstoff über 60 Minuten) und der andere Faktor das Vorliegen von Hyperoxie (80% über 24 Stunden) oder nicht. Die Kontrollgruppe wurde keiner der beiden Behandlungen ausgesetzt.

Tabelle 23: Entstehung der Interventionsgruppen aus zweifaktoriellen Design

Hypoxie + Ischämie	Hyperoxie	
	ja	nein
	ja	C (ja/ ja)
	nein	D (nein/ nein)

A, B, C und D: Bezeichnung Interventionsgruppen

Da die Ischämie (Karotisligatur links) einseitig erfolgte und davon ausgegangen werden muss, dass es ipsilateral und kontralateral zu unterschiedlichen Schädigungen kommen würde, musste der Faktor links/ rechts in den Gruppen Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) auch berücksichtigt werden.

Die Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software R (R-Core-Team, 2015).

2.10.1 Statistische Auswertung des MBP-Scores

Der MBP-Score wird auf einer Ordinalskala angegeben, vergleichbar mit der Bewertung von Keimdichten (Einstufung in „keine“, „spärlich“, „reichlich“, „massenhaft“). Die verschiedenen Werte sind als Kategorien und nicht als numerische Größen zu verstehen. Sie sind die sogenannten ordinalen Variablen.

Ein wichtiges Merkmal ordinaler Daten ist die geordnete Reihenfolge der Stufenausprägungen. Ziel der Auswertung war es herauszufinden, welche Faktoren (Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie) das untersuchte Outcome (MBP-Score) beeinflussen und wie stark dieser Einfluss ausgeprägt ist. Hierzu ist das statistische Werkzeug der Regressionsanalyse geeignet, da sie das Ziel hat, Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen zu untersuchen. Das heißt, hier werden die Wahrscheinlichkeiten

für die MBP-Score-Werte 0 bis 6 in Abhängigkeit verschiedener Einflussgrößen (Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie) berechnet.

Da für die Zielvariablen mehr als 2 ordinale Stufen vorliegen (MBP-Score kann 0, 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 sein), ist eine Erweiterung des binär-logistischen Regressionsmodells notwendig, welches unter dem Begriff *Proportional-Odds-Modell* und dem Synonym: *cumulative odds model*, *ordinal logistic model*, *cumulative logit model* oder *McCullagh's grouped continuous model* bekannt ist (Schlarmann & Galatsch, 2014).

Bei dieser statistischen Methode werden die *Odds* (Wahrscheinlichkeiten) für das Erreichen ranghöherer Bewertungsstufen in Abhängigkeit der Einflussfaktoren modelliert (Agresti, 2012). Grundsätzlich wird beim *Proportional Odds* Modell davon ausgegangen, dass der Einfluss eines Faktors auf diese *Odds* konstant ist, d.h. für jede Bewertungsstufe werden die *Odds*, diese zu überschreiten, durch die Behandlung um den gleichen Faktor (die *Odds-Ratio OR*) verändert.

In der Literatur sind Mindest-Fallzahlen zur Durchführung des oben genannten Modells nicht beschrieben, so dass eine klassische Fallzahlkalkulation durch Herrn B. Greene durchgeführt wurde.

Zuerst wurde die Verteilung der ordinalen Zahlen für die beiden Faktoren Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie aufgeschlüsselt und anschließend die einzelnen Gruppen seitengetrent aufgeführt (siehe 3.2.2 Verteilung MBP-Score). Da für jedes Tier je 3 Bewertungen für jede Seite vorhanden sind, liegen stark korrelierende wiederholte Messungen vor. Aufgrund dieser Messwiederholungen wurde bei der Auswertung des MBP-Scores das *Proportional-Odds-Modell* erweitert, um die intra-individuelle Korrelation der Messwerte adäquat zu berücksichtigen. Eine erwartete Verteilung des MBP-Scores für die verschiedenen Interventionsgruppen wurde anhand der Daten statistisch berechnet. Diese erwarteten Score-Häufigkeiten werden in der Abbildung 24 (3.2.2 MBP-Score - Ergebnisse) mit den aus dem MBP-Score stammenden Ergebnissen (beobachtete Häufigkeit) dargestellt. Im nächsten Schritt wurde die Frage bearbeitet, ob die Interventionen alleine (Ischämie + Hypoxie oder Hyperoxie) oder die Kombination miteinander die Wahrscheinlichkeit (die *Odds*) für einen höheren oder niedrigere Score steigen lässt. In den Zeilen der Tabelle finden sich diese Fragenstellungen wieder, unter p sind die p-Werte aufgeführt, die Größe des Effek-

tes wird in den Spalten *Odds Ratio* als *kumulative OR* zusammen mit einem 95% Konfidenzintervall (KI) angegeben (siehe Tabelle 29). Für jegliche Stufe des MBP-Scores gibt die *Odds Ratio* an, um wie viel durch die Intervention (Ischämie + Hypoxie oder/ und Hyperoxie) die Wahrscheinlichkeit steigt, die Stufe zu überschreiten.

Beim Vorliegen von p-Werten $p < 0,001$ wird von hochsignifikant gesprochen (mit ** markiert und **fett geschrieben**), eine Signifikanz liegt vor bei $p < 0,05$ (mit * markiert und **fett geschrieben**) und ein Trend bei $p < 0,15$ (*kursiv* und **fett geschrieben**).

Die Berechnung des Proportional-Odds-Modell

$$\text{Log-Odds} = \log \left[\frac{F_j(x)}{1-F_j(x)} \right] = a_i + \alpha_j + \beta_1 \times x_1 + \beta_2 \times x_2 + \dots + \beta_p \times x_p$$

Bezeichnungen:

- $F_j(x)$ = Wahrscheinlichkeit für einen Score $> j$ ($j = 0, 1, 2, \dots, 5$) bei Ausprägungen der Einflussfaktoren $x = (x_1, x_2, \dots, x_p)$
- $1 - F_j(x)$ = Wahrscheinlichkeit für Score $\leq j$ bei Ausprägungen der Einflussfaktoren $x = (x_1, x_2, \dots, x_p)$
- Kumulative Odds = $\left[\frac{F_j(x)}{1-F_j(x)} \right]$
- x_1, \dots, x_p = Faktorenwerte
- $\alpha_j, \beta_1, \dots, \beta_p$ = Parameter des Modells (Cutpoints α_j und Koeffizienten β_1, \dots, β_p), die die Verteilung des Scores und den Einfluss der Faktoren auf die Wahrscheinlichkeit für einen Score $> j$ beschreiben. Diese werden mittels der Maximum-Likelihood Methode anhand der Daten geschätzt.
- a_i = Spezifische Wirkung des Tieres i . a_i ist eine Erweiterung des klassischen Proportional-Odds-Modell und bei jeder Messung an Tier i konstant. Unterschiede der a_i -Werte kennzeichnen die a priori Unterschiede zwischen den Tieren. Es wird angenommen, dass a_i über alle Tiere um Null normalverteilt ist.

Formel für Berechnung der Odds Ratio (OR)

Odds-Ratios lassen sich im obigen Modell einfach berechnen als:

$$e^{\beta_k} = \text{OR für Prädiktor } x_k, (k = 1, 2, \dots, p)$$

Histologische Fragestellungen

Aus den Hypothesen wurden folgende Fragestellungen (siehe 1.11 Ziel der Arbeit) entwickelt, die mit dem MBP-Score überprüft werden sollten:

Effekt Hyperoxie - Führt die Exposition gegenüber Hyperoxie zu höheren MBP-Score-Werten?

- Interaktion zwischen Hyperoxie und Ischämie + Hypoxie - Führt die Exposition gegenüber Hyperoxie zusammen mit Ischämie + Hypoxie zu einer anderen Veränderung des Scores, als wenn nur die Effekte der beiden Interventionen addiert werden?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der rechten Gehirnhälfte - Sind die MBP-Scores in rechten Hemisphären anders in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie als in den Gruppen ohne Ischämie + Hypoxie?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der linken Gehirnhälfte - Sind die MBP-Scores in linken Hemisphären anders in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie als in den Gruppen ohne Ischämie + Hypoxie?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der rechten Gehirnhälfte im Vergleich zur linken Gehirnhälfte - Gibt es einen Unterschied im MBP-Score zwischen der rechten und linken Hemisphäre in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie?
- Effekt des Geschlechtes - Gibt es Unterschiede des MBP-Scores zwischen Weibchen und Männchen?

2.10.2 Statische Auswertung der Genexpressionsanalyse

Für jedes Gen wurde ein gemischtes lineares Modell verwendet, um die ΔCT -Werte des Genes bzw. der entsprechenden HPRT-Messungen in den 6 Behandlungsgruppen Ischämie + Hypoxie links (Gruppe A-L), Ischämie + Hypoxie rechts (Gruppe A-R), Hyperoxie (Gruppe B), Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (Gruppe C-L), Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (Gruppe C-R) und Kontrollgruppe (Gruppe D) zu den Zeitpunkten P7, P11 und P21 zu berechnen. Dies geschah, um den Einfluss der Behandlungen Haupteffekte Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie auf die Änderung im $\Delta\Delta\text{CT}$ zwischen P7 und P11, P11 und P21, und P7 und P21 zu untersuchen. Gemischte Effekte wurden

verwendet, um die Korrelation zwischen Messungen am gleichen Tier und im gleichen qPCR-Lauf zu berücksichtigen.

$$CT = \beta_{klm} + a_i + b_j + \epsilon$$

- β_{klm} = Erwarteter CT-Wert für das Gen k ($k = \text{Epo1, TNF}\alpha, \dots, \text{HPRT}$) der Gruppe l am Tag m
- a_i = Spezifische Wirkung des Tieres i . a_i ist bei jeder Messung an Tier i konstant. Unterschiede der a_i -Werte kennzeichnen die a priori Unterschiede zwischen den Tieren. Es wird angenommen, dass a_i über alle Tiere um Null normalverteilt ist.
- b_j = Spezifische Wirkung des qPCR-Laufes j . b_j ist bei jeder Messung an im qPCR-Lauf j konstant. Es wird angenommen, dass b_j über alle Läufe um Null normalverteilt ist.

Fragestellungen an die Genexpressionsanalyse

Aus den Hypothesen (siehe 1.11 Ziel der Arbeit) wurden folgende Fragestellungen an die Genexpressionsanalyse entwickelt und mittels der o.g. statistischen Methoden überprüft:

- Effekt Hyperoxie - Wirkt sich die Exposition gegenüber Hyperoxie auf Veränderungen des ΔCT -Wertes im Laufe der Zeit aus?
- Interaktion zwischen Hyperoxie und Ischämie + Hypoxie - Führt die Exposition gegenüber Hyperoxie zusammen mit Ischämie + Hypoxie zu einem größeren Effekt auf die Veränderungen des ΔCT -Wertes im Laufe der Zeit, als wenn nur die Effekte der beiden Interventionen addiert werden?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der rechten Gehirnhälfte - Sind die Veränderungen des ΔCT -Wertes im Laufe der Zeit in den rechten Hemisphären anders in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie als in den Gruppen ohne Ischämie + Hypoxie?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der linken Gehirnhälfte - Sind die Veränderungen des ΔCT -Wertes im Laufe der Zeit in den linken Hemisphären anders in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie als in den Gruppen ohne Ischämie + Hypoxie?
- Effekt von Ischämie + Hypoxie in der rechten Gehirnhälfte im Vergleich zur linken Gehirnhälfte - Sind die Veränderungen des ΔCT -Wertes im Laufe der

Zeit in den Gruppen mit Ischämie + Hypoxie unterschiedlich zwischen der rechten und linken Hemisphäre?

- Effekt des Geschlechtes - Gibt es Unterschiede des Δ CT-Wertes zwischen Weibchen und Männchen?
- Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit - Sind die Veränderungen des Δ CT-Wertes im Laufe der Zeit unterschiedlich zwischen Weibchen und Männchen?

3 Ergebnisse

3.1 Mortalität im Rice-Vannucci-Modell

Im vorliegenden Versuch überlebten 74,8 % der eingeschlossenen Rattenwelpen (Tabelle 24). Am OP-Tag (P6) verstarben 23,2 % der Tiere an Komplikationen, im Verlauf weitere 2 %.

Tabelle 24: Überlebensrate

Durchgang	1	2	3	4	5	gesamt
Welpen im Versuch	22	26	31	38	34	151 (100 %)
Durch Komplikationen am OP-Tag verstorbene Welpen	3	2	12	11	7	35 (23,2 %)
Durch Komplikationen im Verlauf verstorbene Welpen	0	1	0	0	2	3 (2 %)
Überlebende Welpen	19	23	19	27	25	113 (74,8 %)
Welpen Histologie	7	11	7	12	22	59
Welpen qPCR	12	12	12	15	3	54 (48 in qPCR)

Beeinträchtigte und sich nicht entwickelnde Tiere wurden vorzeitig getötet. Die nicht im Versuch genutzten Tiere (Mütter und Welpen) wurden zu Organentnahmen euthanasiert. 6 Tiere für die Genexpressionsanalyse wurden wegen makroskopischer Auffälligkeiten des Gehirns von der Untersuchung ausgeschlossen.

3.1.1 Todesursachen im Rice-Vannucci-Modell

Der Tod in der Hypoxie war mit 68,4 % die häufigste Komplikation. Am OP-Tag waren letale Blutverluste mit 13,2 % die zweithäufigste Todesursache und Narkose-Zwischenfälle waren mit 5,3 % die dritthäufigste Todesursache. 2,6 % der verstorbenen Welpen wurden von der Mutter am OP-Tag (P6) gefressen. Je 2,6 % der Todesursachen waren: Tod nach Antagonisierung der Narkose, Fressen durch die Mutter im Verlauf (nach P6), Euthanasie wegen stagnierender Gewichtszunahme und Narkose-Zwischenfälle an P11 (Augenuntersuchung u. MRT).

Tabelle 25: Übersicht über Todesursachen

Ursache / Durchgang	1	2	3	4	5	gesamt
Narkose am OP-Tag	1	1	0	0	0	2 (5,3 %)
Verbluten unter OP	1	0	1	2	1	5 (13,2 %)
Nach Antagonisierung Narkose	0	0	1	0	0	1 (2,6 %)
Hypoxie	1	1	10	9	5	26 (68,4 %)
Gefressen durch Mutter an P6	0	0	0	0	1	1 (2,6 %)
Gefressen durch Mutter im Verlauf	0	0	0	0	1	1 (2,6 %)
Euthanasie wegen stagnierender Gewichtszunahme	0	0	1	0	0	1 (2,6 %)
Narkose an P11 (Augenuntersuchung u. MRT)	0	0	0	0	1	1 (2,6 %)
Narkose an P21 (Augenuntersuchung u. MRT)	0	0	0	0	0	0 (0 %)
Gesamtsumme:	3	2	13	11	9	38

3.2 Histologie

3.2.1 Komplikation Infarkt im Rice-Vannucci-Modell

Von den 19 operierten Tieren aus Gruppe A und C hatten 11 einen Hirninfarkt. Damit betrug die Infarktrate 58 %. In der Gruppe Ischämie + Hypoxie (A) hatten 40 % und in der Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C) 78 % einen Infarkt (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht Infarkte

Gruppe	Tiere pro Gruppe	Infarkte	Makroinfarkt	Mikroinfarkt
A (Ischämie + Hypoxie)	10	4 (40 %)	3 Tiere	1 Tier
B (Hyperoxie)	5	keine	keine	keine
C (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie)	9	7 (78 %)	6 Tiere	1 Tier
D (Kontrollgruppe)	7	keine	keine	keine

A, B, C und D: Bezeichnung Gruppen

H: Histologie

I: Infarkt

Vor allem traten Makroinfarkte auf, die teilweise mit dem Verlust der kompletten Hemisphäre einhergingen (Abbildung 22).

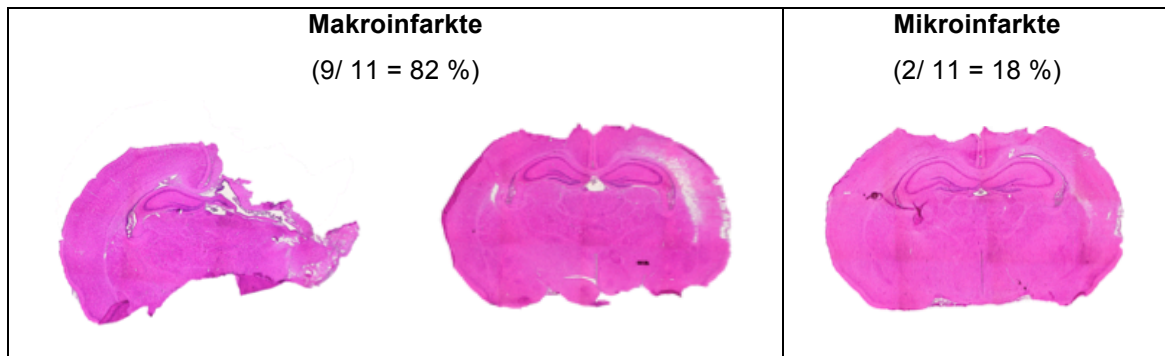


Abbildung 22: Makroinfarkte vs. Mikroinfarkte

Mikroinfarkte waren nur mit Hilfe des Mikroskops und entsprechender Vergrößerung erkennbar, wie Abbildung 23 zeigt:

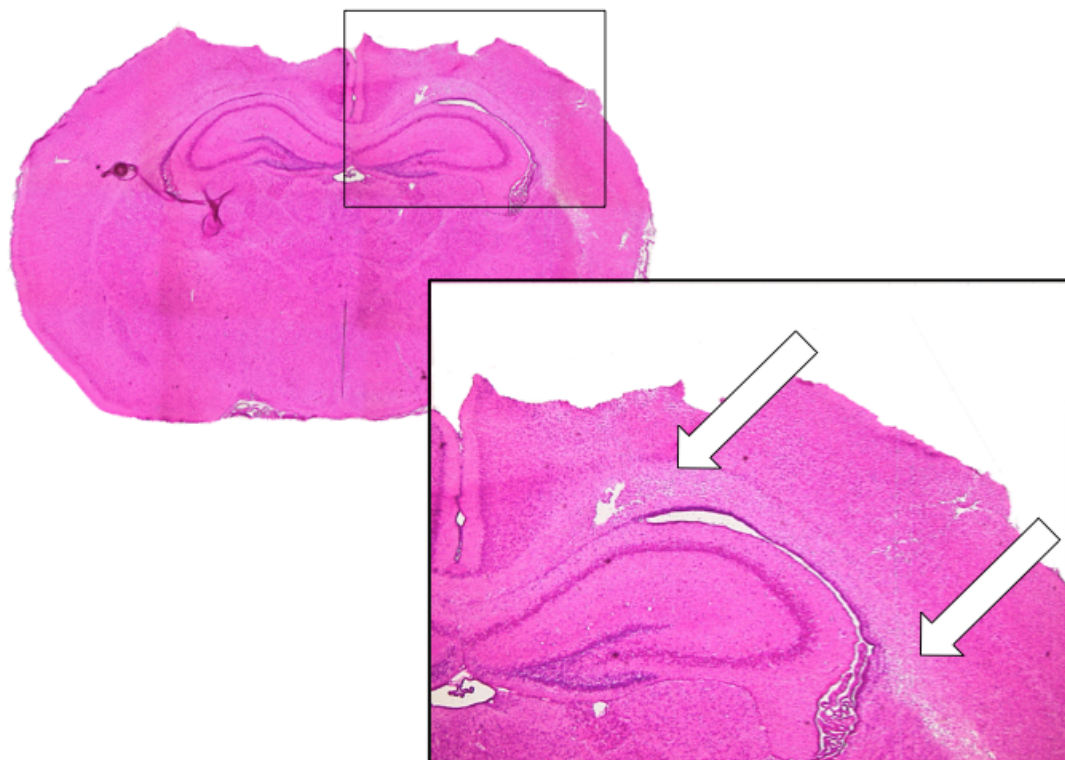


Abbildung 23: Mikroinfarkt

3.2.2 MBP-Score - Ergebnisse

Verteilung MBP-Score

Aufschlüsselung der Verteilung des MBP-Scores nach Interventionsgruppen:

Tabelle 27: Verteilung des MBP-Score nach Gruppen

Score	n _{A-L}	% _{A-L}	n _{A-R}	% _{A-R}	n _{B-L}	% _{B-L}	n _{B-R}	% _{B-R}
0	0	0,0	1	3,3	0	0,0	0	0,0
1	1	3,3	7	23,3	3	20,0	3	20,0
2	3	10,0	12	40,0	9	60,0	7	46,7
3	4	13,3	7	23,3	2	13,3	5	33,3
4	8	26,7	3	10,0	1	6,7	0	0,0
5	5	16,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	9	30,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
gesamt	30	100,0	30	100,0	15	100,0	15	100,0

Score	n _{C-L}	% _{C-L}	n _{C-R}	% _{C-R}	n _{D-L}	% _{D-L}	n _{D-R}	% _{D-R}
0	0	0,0	2	7,4	9	42,9	9	42,9
1	0	0,0	6	22,2	2	9,5	4	19,1
2	1	3,7	8	29,6	8	38,1	5	23,8
3	4	14,8	10	37,0	0	0,0	3	14,3
4	1	3,7	1	3,7	2	9,5	0	0,0
5	9	33,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	12	44,4	0	0,0	0	0,0	0	0,0
gesamt	27	100,0	27	100,0	21	100,0	21	100,0

n: Aufgetretene Häufigkeit

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B-L: Hyperoxie links

B-R: Hyperoxie rechts

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D-L: Kontrollgruppe links

D-R: Kontrollgruppe rechts

In der Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) wurden nur auf der linken Seite (ipsilateral zur Karotisligatur links) die beiden höchsten Grade (MBP-Score 5 u. 6) der Schädigung erreicht (5: 16,7%, 6: 30%). Auf der ipsilateralen Seite zur Karotisligatur links wurde nie der Score von 0 vergeben, d.h. es lag immer eine Schädigung vor.

Rechts trat in der Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) ein MBP-Score 5 u. 6 nicht auf, kontralateral zur Intervention war damit der Schaden weniger ausgeprägt als auf der Seite ipsilateral zur Karotisligatur. Mit einem MBP-Score von 2 wurden 40 % der Proben bewertet.

In der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B) wurde der Score von 0 nie vergeben, d.h. eine Schädigung war immer sichtbar. Die Schädigung war jedoch nie so stark, dass sie mit einem Score von 5 oder 6 bewertet wurde. Die meisten Tiere der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B) hatten einen Grad der Schädigung von 1 bis 3, mit einer Häufung (links: 60 %; rechts 46,7 %) bei einer Bewertung mit 2.

In der Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie-Gruppe (Gruppe C) war links mit 44,4 % die häufigste Schädigung ein MBP-Score von 6; rechts hatten die meisten Tiere (37 %) einen Schaden von 3. Auf der linken Seite der Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie-Gruppe (Gruppe C) wurde nie ein Score von 0 oder 1 erreicht, d.h. es lag links immer eine Schädigung vor. Rechts wurde in dieser Gruppe nie ein Score von 5 oder 6 vergeben, gleichbedeutend damit, dass die Karotisligatur links ipsilateral einen deutlich stärkeren Schaden verursacht hatte als kontralateral.

In der Kontrollgruppe (Gruppe D) wurde bei 42,9 % der Bilder der Score von 0 vergeben, also kein Schaden nachgewiesen. Nie wurde in der Kontrollgruppe eine Bewertung mit einem Score ≥ 5 vergeben, es lagen also nie die 2 schwersten Formen der Schädigung vor.

Beobachtete und erwartete Score-Häufigkeiten

Die Abbildung 24 zeigt die beobachteten Häufigkeiten (MBP-Scoring durch B. Reich geb. Gerstner) jeder Interventionsgruppe mit den statistisch erwarteten Verteilungen aus dem Regressionsmodell darüber eingetragen (Originaldaten im Anhang).

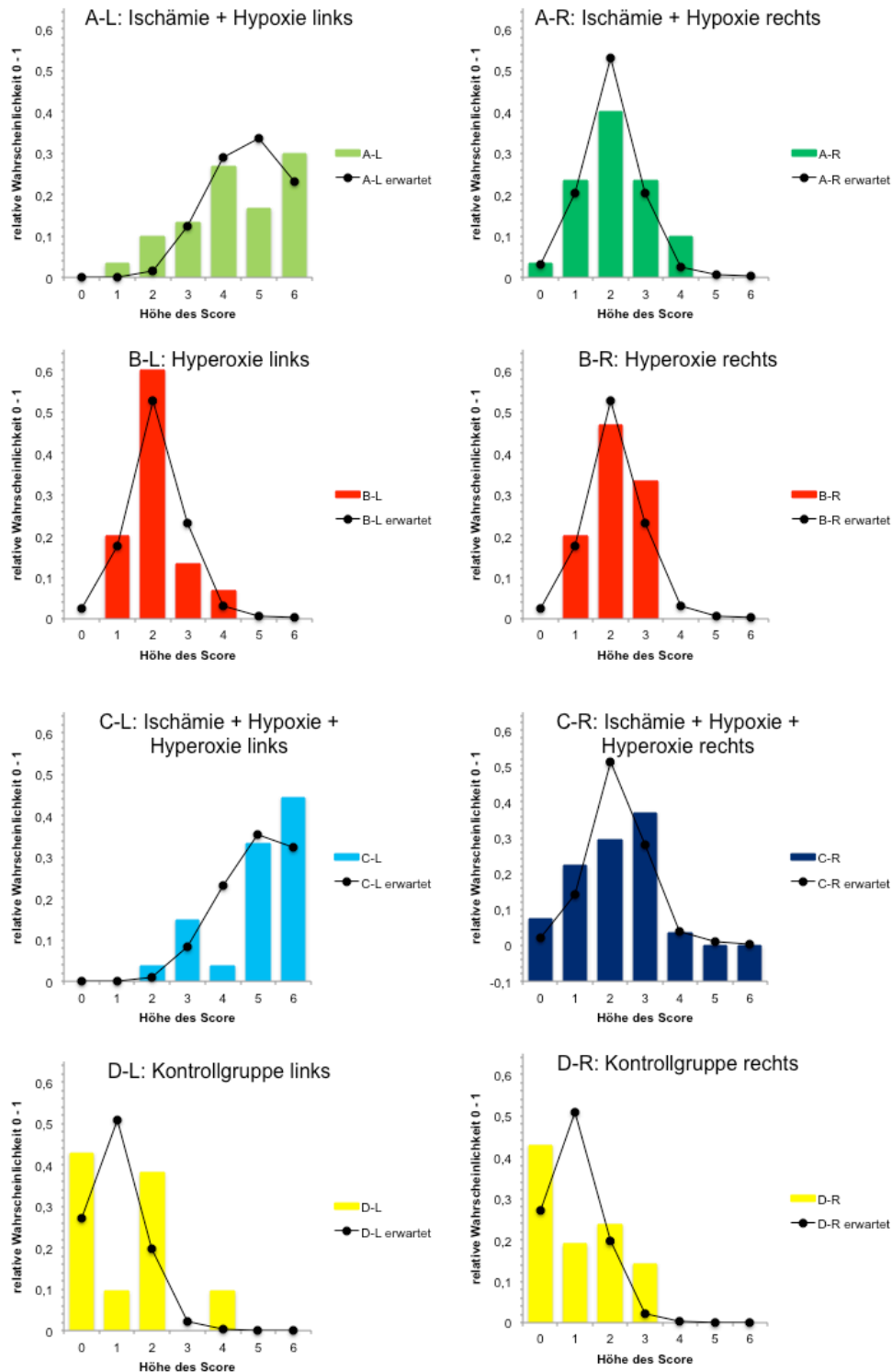


Abbildung 24: Beobachtete und erwartete MBP-Score-Häufigkeiten und -werte nach Interventionsgruppen

A-L: Ischämie + Hypoxie links
A-R: Ischämie + Hypoxie rechts
B-L: Hyperoxie links
B-R: Hyperoxie rechts
C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links
C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts
D-L: Kontrollgruppe links
D-R: Kontrollgruppe rechts

In der Gruppe Ischämie + Hypoxie links (Gruppe A-L) wurde die höchste relative Frequenz für einen Score von 5 berechnet. 8/ 30 Bildern wurden mit einem Score von 4, 5/ 30 Bildern mit einem Score von 5 und 9/ 30 Bildern mit einem Score von 6 bewertet. Die restlichen Bilder hatten eine Score ≤ 3 .

Die höchste relative Frequenz (von ca. 0,5) in der Gruppe Ischämie + Hypoxie rechts (Gruppe A-R) wurde bei einem Score von 2 berechnet. In der Gruppe Ischämie + Hypoxie rechts (Gruppe A-R) wurde am häufigsten mit einem Score von 2 bewertet, nämlich 12/ 30 Bildern erreichten diesen Score., dh. die erwartete Häufigkeit konnte durch unsere Daten bestätigt werden. Die restlichen Bilder wurden mit einem niedrigerem oder höheren Score bewertet.

In der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B) wurde mit einer relativen Frequenz von 0,5 ein Score von 2 berechnet. Im vorliegenden Versuch wurden in der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B) rechts 7/ 15 Bilder mit einem Score von 2 bewertet. Auf der linken Seite waren es 9/ 15 Bilder. Auch in der Gruppe B stimmen erwartete und beobachtete Häufigkeit überein.

Auf der linken Seite der Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) wurde mit einer relativen Frequenz von 0,35 ein Score von 5 erwartet, dies konnte mit 9/ 27 Bildern bestätigt werden, allerdings wurden 12/ 27 Bildern mit einem Score von 6 bewertet.

Für die Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (Gruppe C-R) wurde ein Score von 2 erwartet, 6/ 27 Bildern wurden mit einem Score von 1, einem Score von 2 8/ 27 Bilder und 10/ 27 mit einem Score von 3 bewertet.

Für die Kontrollgruppe (Gruppe D) wurde auf beiden Seiten ein Score von 1 mit einer relativen Frequenz von 0,5 erwartet. Auf der linken Seite wurden 9/ 21 Bilder mit einem Score von 0 bewertet, 2/ 21 Bilder mit einem Score von 1 und 8/ 21 Bilder mit einem Score von 2. 9/ 21 Bilder erreichten auf der rechten Seite der Kontrollgruppe (D) einen Score von 0, 4/ 21 Bildern einen Score von 1 und 5/ 21 Bildern einen Score von 2.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Gruppen mit der Ischämie + Hypoxie (Gruppe A und C) auf der ipsilateralen Seite der Intervention häufiger als erwartet ein MBP-Score von 6 auftrat. Es wurde die höchste relative Frequenz bei einem Score von 5 erwartet, bei den vorliegenden Daten trat ein Score von 6 häufiger auf als erwartet.

In der Gruppe Ischämie + Hypoxie rechts (Gruppe A-R) waren erwartete und beobachtete Häufigkeiten der Score-Verteilung gleich. In der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B) stimmten die erwarteten und die beobachteten MBP-Werte größtenteils überein.

In der Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (Gruppe C-R) wurde als häufigster Score eine 2 erwartet. In den von der Arbeitsgruppe ermittelten Scores waren ein Score von 1 oder 3 häufiger als erwartet und ein Score von 2 weniger häufig als erwartet.

In der Kontrollgruppe (Gruppe D) erreichten mehr Proben einen Score von 0 als erwartet, jedoch auch mehr als erwartet erreichten einen Score von 2. Als häufigste relative Frequenz war in der Kontrollgruppe (D) ein Score von 1 erwartet worden, er trat jedoch deutlich seltener als erwartet auf.

MBP-Score - Interventionsgruppen im Vergleich

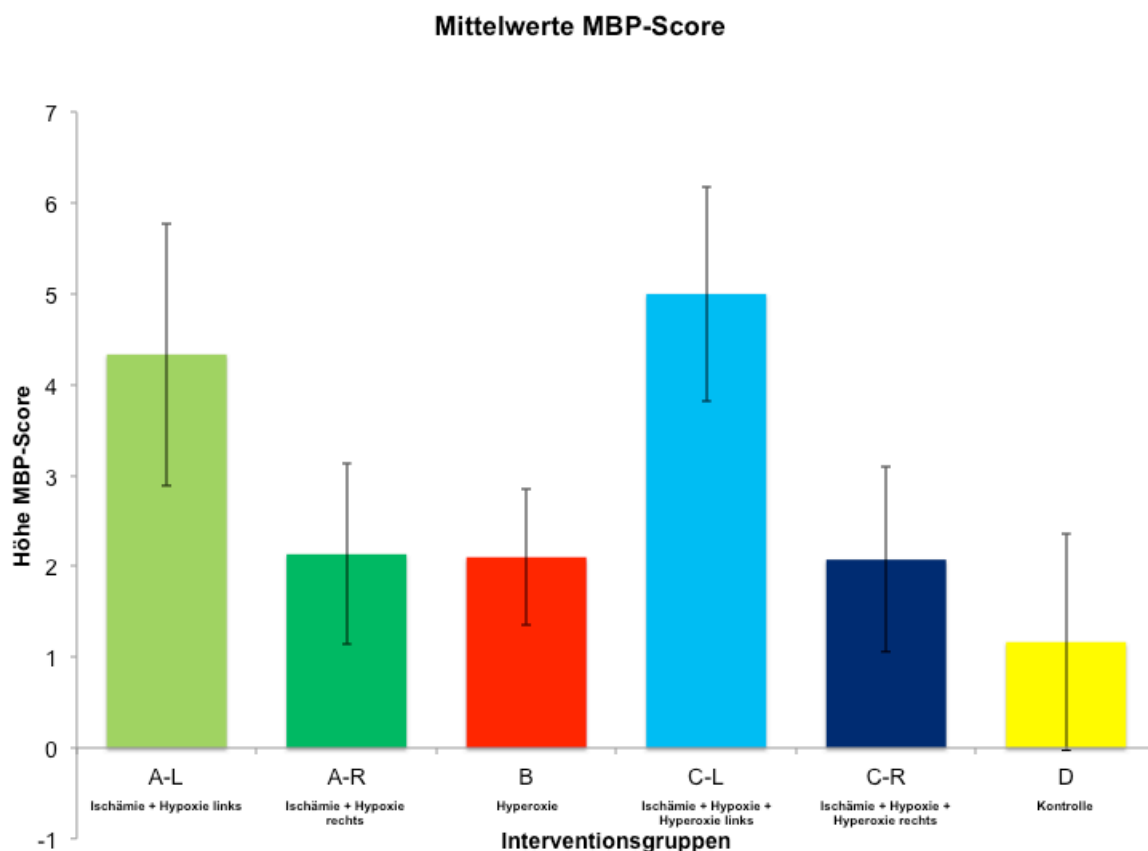


Abbildung 25: Übersicht über Mittelwerte des MBP-Score der verschiedenen Interventionsgruppen

A-L: Ischämie + Hypoxie links
A-R: Ischämie + Hypoxie rechts
B: Hyperoxie
C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links
C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts
D: Kontrollgruppe

In der Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) wurde die linke Seite im Mittelwert mit einem Score von 4,3, die rechte Seite mit 2,13 bewertet. Im Mittelwert wurde die Gruppe Hyperoxie (Gruppe B) mit einem Score von 2,1 bewertet. Bei Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) wurde links die Schädigung mit einem MBP-Score von 5 und rechts von 2,1 beurteilt. Als Kontrollgruppe diente Gruppe D, die im Mittel mit einem Score von 1,2 beurteilt wurde. Die Darstellung in Mittelwerten gibt einen Überblick über die Verteilung, ist aber statistisch gesehen nicht das Mittel der Wahl, da es sich beim MBP-Score um Bewertungskategorien handelt und nicht um numerische Größen.

Tabelle 28 vergleicht die verschiedenen Interventionsgruppen Ischämie + Hypoxie links (A-L), Ischämie + Hypoxie rechts (A-R), Hyperoxie (B), Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L), Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) und Kontrollgruppe (D).

Tabelle 28: Ergebnisse MBP-Score Interventionsgruppen im Vergleich zueinander

	<i>Odds Ratio</i> mit KI	p
A-L (Ischämie + Hypoxie links) vs. A-R (Ischämie + Hypoxie rechts)	98,99 (98,37-99,68)	0,000 **
A-L (Ischämie + Hypoxie links) vs. B (Hyperoxie)	115,70 (16,33-819,75)	0,000 **
A-L (Ischämie + Hypoxie links) vs. C-L (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links)	0,27 (0,06-1,20)	0,084
A-L (Ischämie + Hypoxie links) vs. C-R (Ischämie + Hypoxie rechts)	135,23 (27,47-665,81)	0,000 **
A-L (Ischämie + Hypoxie links) vs. D (Kontrollgruppe)	1637,62 (272,6-9828,09)	0,000 **
A-R (Ischämie + Hypoxie rechts) vs. B (Hyperoxie)	1,17 (0,17-8,28)	0,876
A-R (Ischämie + Hypoxie rechts) vs. C-L (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links)	0,003 (0,001-0,01)	0,000 **
A-R (Ischämie + Hypoxie rechts) vs. C-R (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts)	1,37 (0,28-6,73)	0,702
A-R (Ischämie + Hypoxie rechts) vs. D (Kontrollgruppe)	16,53 (2,75-99,29)	0,002 *
B (Hyperoxie) vs. C-L (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links)	0,002 (0,00-0,03)	0,000 **
B (Hyperoxie) vs. C-R (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts)	1,17 (0,11-12,81)	0,898

oxie rechts)		
B (Hyperoxie) vs. D (Kontrollgruppe)	14,15 (1,15-174,51)	0,039 *
C-L (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links) vs. C-R (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts)	509,79 (153,09-1697,65)	0,000 **
C-L (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links) vs. D (Kontrollgruppe)	6173,37 (595,26-64023,15)	0,000 **
C-R (Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts) vs. D (Kontrollgruppe)	12,11 (1,29-114,09)	0,029 *

OR: Odds Ratio

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

A-L, A-R, B-L, B-R, C-L und C-R, D-L und D-R: Bezeichnung Interventionsgruppen

- Ischämie + Hypoxie links (A-L) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) sind gegenüber allen anderen hochsignifikant schädlich verändert ($p < 0,001$).
- Linke Seiten sind gegenüber rechten Seiten bei Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) hochsignifikant schädlich verändert ($p < 0,001$).
- Für Unterschied zwischen Ischämie + Hypoxie links (A-L) gegenüber Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) ist nur ein Trend erkennbar. Es scheint, als ob die zusätzliche Hyperoxie keinen wirklichen Effekt hat, wenn eine Karotisligatur vorliegt.
- Der Unterschied zwischen Hyperoxie (B) und der Kontrollgruppe (D) ist signifikant, d.h., dass Hyperoxie einen signifikanten Effekt hat bzw. zu einer entsprechenden Schädigung führt.
- Rechte Seiten von Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) sind signifikant anders als Kontrollgruppe (Gruppe D). Der Eingriff der Karotisligatur hat auf der kontralateralen Seite auch einen schädigenden Effekt.

Auswertung Fragestellungen an MBP-Score

Der MBP-Score wird in Form von ordinalen Daten angegeben, dafür ist die geordnete Reihenfolge der Stufenausprägungen charakteristisch. Um herauszufinden, welche Faktoren (Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie) das untersuchte Outcome (MBP-Score) beeinflussen und wie stark dieser Einfluss ausgeprägt

ist, wurde die ordinale logistische Regressionsanalyse mit gemischten Effekten verwendet.

In den Zeilen der Tabelle 29 finden sich diese Fragestellungen wieder. Die Größe des Effektes wird in den Spalten Odds Ratio als kumulative Odds Ratio zusammen mit einem 95% KI angegeben. Für jegliche Stufe des MBP-Scores gibt die Odds Ratio an, um wie viel aufgrund der Intervention (Ischämie + Hypoxie oder/ und Hyperoxie) die Wahrscheinlichkeit steigt, die Stufe zu überschreiten.

Tabelle 29: Einfluss von Interventionen auf MBP-Score mit Odds Ratio mit 95% KI und p-Wert

MBP	Odds Ratio mit KI	p
Hyperoxie	13,75 (1,16-163,20)	0,038 *
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie	0,12 (0,01-2,58)	0,173
Ischämie + Hypoxie links	2123,89 (193,64-23318,45)	0,000 **
Ischämie + Hypoxie rechts	11,40 (1,36-95,97)	0,025 *
Ischämie + Hypoxie links - rechts	186,23 (59,80-579,98)	0,000 **

OR: Odds Ratio

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Folgende Ergebnisse sind aus der Tabelle 29 zu erkennen:

- Mit einer Odds Ratio von 13,75 wurde die Wahrscheinlichkeit, einen beliebigen Scorewert zu überschreiten, nach Behandlung mit Hyperoxie signifikant erhöht ($p=0,038$), d.h. es kam zu einer Schädigung nach Hyperoxie.
- Für die Frage nach der Interaktion zwischen den Interventionen Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie zeigt sich keine Signifikanz.
- Nach einer Intervention mit Ischämie + Hypoxie beträgt die Wahrscheinlichkeit einen beliebigen Scorewert zu überschreiten in der linken Gehirnhälfte 2123,9 (Odds Ratio); auf der rechten Seite 11,4 (Odds Ratio), d.h. links war die Schädigung stärker als rechts.

Damit gibt es einen signifikant schädigenden Effekt bei der Behandlung mit Ischämie + Hypoxie für die linke und rechte Hemisphäre im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Stärke des Effektes ist auf der linken Seite viel größer als auf der rechten Seite des Gehirns.

Durch die große Differenz der Stärke der Schädigung links vs. rechts (im Vergleich zur Kontrollgruppe) ist der Unterschied zwischen der rechten und linken Hemisphäre in der Gruppen mit Ischämie + Hypoxie (hier im Vergleich zueinander) auch signifikant.

3.3 Molekularbiologie

3.3.1 RNA – Qualität

Die RNA-Qualitätskontrolle für Proben von P7, P11 und P21 ist nachfolgend abgebildet. Abbildung 26 steht beispielhaft für alle durchgeführten Versuche und RNA-Proben. Die beiden Banden stellen die 18S- (1800 Nukleotide) sowie die 28S- (5000 Nukleotide) Untereinheiten der RNA dar, welche aufgrund ihrer Größe gut voneinander unterschieden werden können.

Die beiden Banden an P7 und P11 zeigen eine stärkere Intensität und Dicke als an P21, d.h. es liegen höhere RNA-Gehalte vor. Wichtiger als die Quantität der RNA ist jedoch die Qualität. Die deutliche Abgrenzung der beiden Banden und die nicht vorhandene diffuse Verteilung der RNA auf die gesamte Gelstrecke weisen auf eine qualitativ hochwertige und intakte RNA hin. Unter dieser Voraussetzung kann im Folgenden auch eine sichere und effiziente PCR durchgeführt werden.

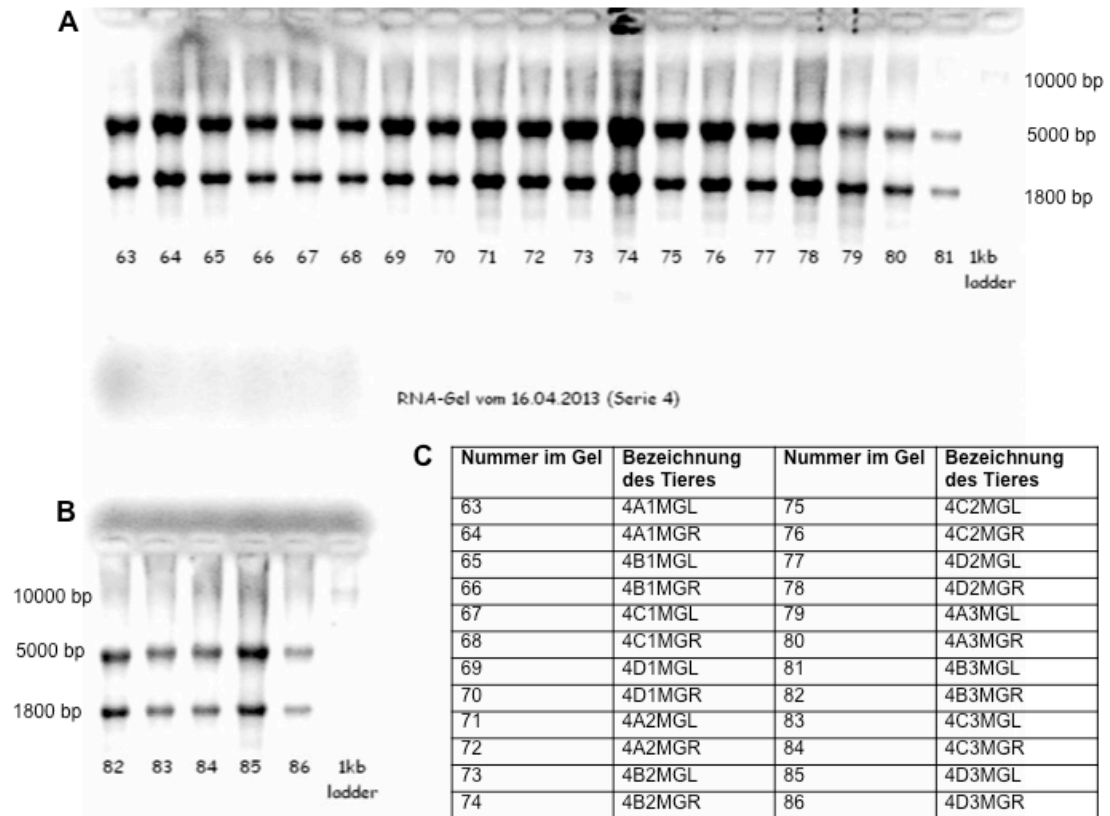


Abbildung 26: Nachweis der RNA-Qualität

A: Teil 1 des Gel-Bildes zur Überprüfung der RNA-Qualität beispielhaft an 24 Tieren der Serie 4
 B: Teil 2 des Gel-Bildes zur Überprüfung der RNA-Qualität beispielhaft an 24 Tieren der Serie 4
 C: Tabelle mit Nummern des Gel-Bildes und dazugehörigen Bezeichnungen der Tiere; Bsp. A1MGL: A: Gruppe A, 1: Tier von p7, M: Molekularbiologie, GL: Gehirn links
 bp: Basenpaare

3.3.2 Genexpressionsanalyse

Die Expressionslevel der folgenden Gene wurden in der vorliegenden Arbeit analysiert:

- Epo-R (*erythropoietin receptor*)
- HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1, α subunit*)
- NOS-2 (*inducible nitric oxide synthase 2*)
- TNF α (*tumor necrosis factor α*)
- VEGF-A164 (*vascular endothelial growth factor-A164*)

Die Ergebnisse für alle 5 untersuchten Gene in den Gruppen Ischämie + Hypoxie links (A-L), Ischämie + Hypoxie rechts (A-R), Hyperoxie (B), Ischämie + Hy-

poxie und Hyperoxie links (C-L) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) sind in Abbildung 27 bis Abbildung 31 zusammengefasst.

Mit Hilfe des Referenzgens HPRT und der Kontrollgruppe konnte die *baseline* errechnet werden, die das physiologische Expressionslevel darstellt. Sie wird auf der y-Achse in der Höhe eines *fold change* von 1 aufgetragen. An P7, P11 und P21 werden die Abweichungen von der *baseline* untersucht und im zeitlichen Verlauf von links nach rechts dargestellt.

3.3.3 Epo-R

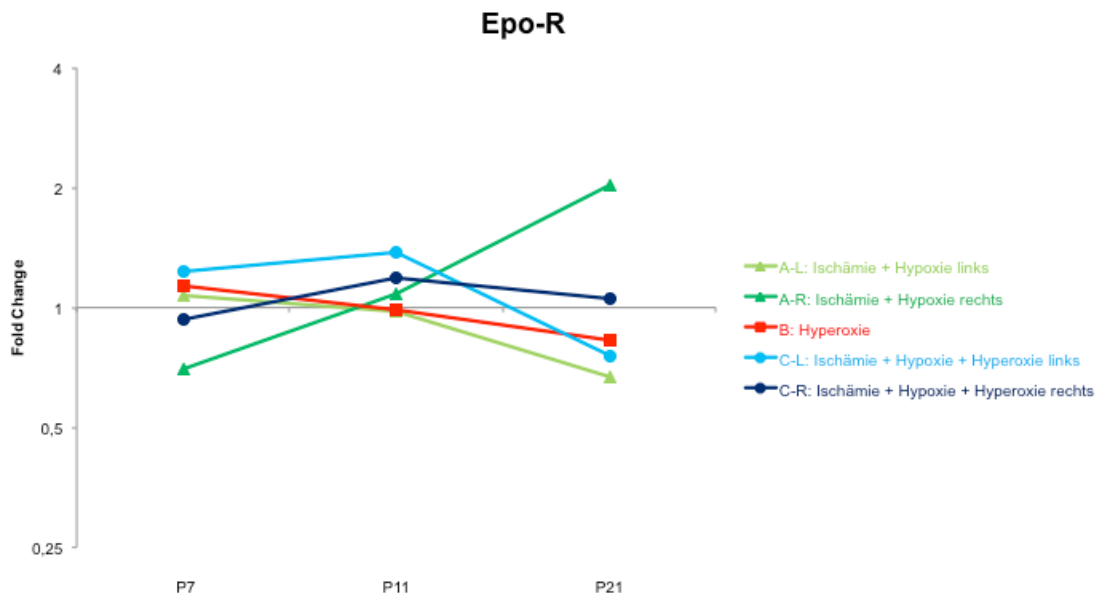


Abbildung 27: Expressionslevel Epo-R für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21

P: postnataler Tag

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B: Hyperoxie

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D: Kontrollgruppe

Gruppe Ischämie + Hypoxie links (A-L) liegt an P7 mit 1,07 leicht über der *baseline*, an P11 fast genau auf der *baseline* und an P21 kommt es zu einer Herunterregulation auf 0,67 unterhalb der *baseline*. Gruppe Ischämie + Hypoxie rechts (A-R) ist mit 0,70 an P7 unter die *baseline* reguliert, an P11 liegt sie knapp über der *baseline*. An P21 kommt es zu einer Hochregulation auf 2,04, dem höchsten Wert verglichen mit den anderen Gruppen. Das Expressionsniveau der Gruppe Hyperoxie (B) zeigt sich an P7 leicht über der *baseline*, an P11 genau auf der *baseline* und liegt an P21 unter der *baseline*. Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) liegt an P7 und P11 leicht über der *baseline*, an P21 fällt sie auf 0,8 unter die *baseline* ab. Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) verhält sich fast parallel zu Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) an P7 und P11, an P21 liegt sie jedoch leicht (1,06) über der *baseline*.

Die Ergebnisse der Tabelle 30 zeigen:

- Für Ischämie + Hypoxie zwischen P7 und P21 bedeutet der Wert 1,48, dass sich der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert um 1,5 $\Delta\Delta\text{CT}$ stärker für die linken Hemisphären der Gruppe Ischämie + Hypoxie (A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C) verändern als für die rechten.
- Für den Zeitraum P11 zu P21 ist für Ischämie + Hypoxie ein Trend ($p=0,089$) sichtbar.

Es zeigten sich signifikante Veränderungen für Ischämie + Hypoxie-Effekt links versus rechts zwischen P7 und P21, d.h. es gab signifikante Veränderungen im Vergleich zwischen links und rechts für die Gruppen Ischämie + Hypoxie (A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C). Zwischen P7 und P11 sind die Daten kaum signifikant unterschiedlich ($p>0,05$). Der Effekt Hyperoxie ist für die Expression von Epo-R nicht relevant.

Tabelle 30: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 Epo-R

Epo-R	$\Delta\Delta\text{CT}$ mit KI	p
Hyperoxie P7 zu P11	0,19 (-0,98-1,36)	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,30 (-1,83-1,23)	0,999
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,47 (-1,64-0,69)	0,891
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,10 (-0,94-1,14)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11	0,57 (-0,41-1,56)	0,585
Hyperoxie P7 zu P21	0,68 (-0,49-1,85)	0,593
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,14 (-1,66-1,39)	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,97 (-2,12-0,19)	0,164
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,51 (-0,53-1,55)	0,761
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P21	1,48 (0,05-2,46)	0,000 **
Hyperoxie P11 zu P21	0,49 (-0,68-1,66)	0,879
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,16 (-1,36-1,68)	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,49 (-1,64-0,66)	0,867
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,41 (-0,63-1,45)	0,906
Ischämie + Hypoxie L-R P11 zu P21	0,90 (-0,07-1,88)	0,089

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

3.3.4 *HIF-1 α*

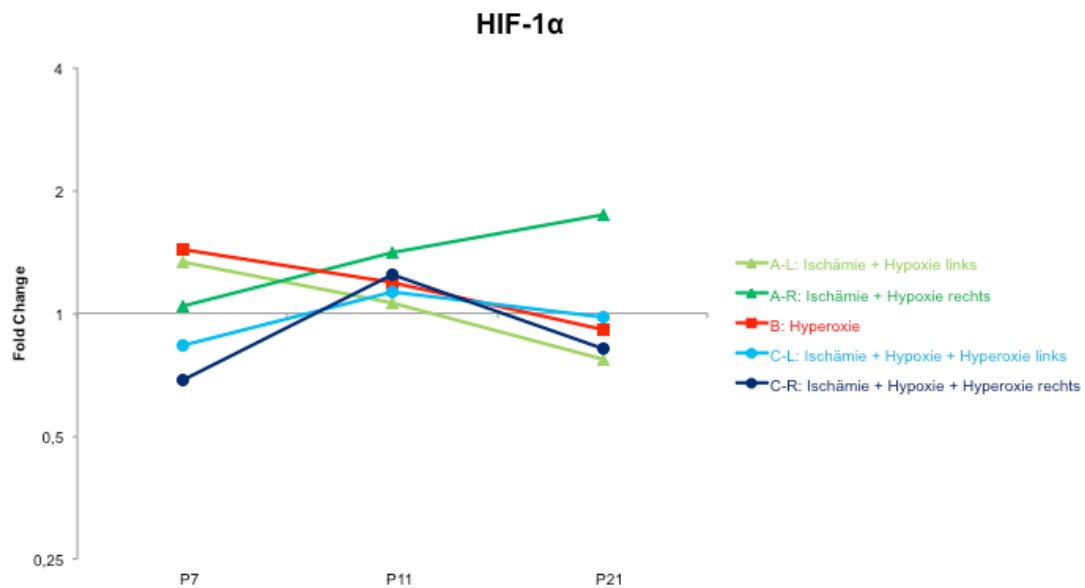


Abbildung 28: Expressionslevel HIF-1 α für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21

P: postnataler Tag

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B: Hyperoxie

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D: Kontrollgruppe

In allen Gruppen und an allen Untersuchungstagen ist die Expression von HIF-1 α nur minimal verändert ($p > 0,05$) und ist somit nicht signifikant (Originaldaten Tabelle 39 im Anhang).

3.3.5 NOS-2

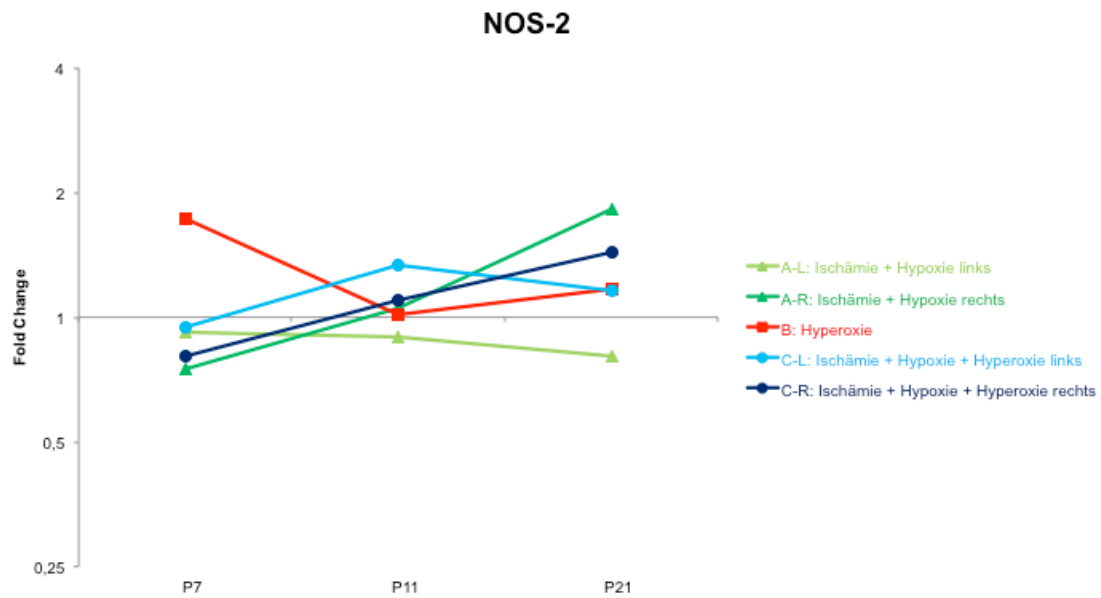


Abbildung 29: Expressionslevel NOS-2 für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21

P: postnataler Tag

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B: Hyperoxie

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D: Kontrollgruppe

Die Expression von NOS-2 in allen Gruppen und an allen Untersuchungstagen ist nur minimal verändert ($p > 0,05$) und somit nicht signifikant (Originaldaten Tabelle 40 im Anhang).

3.3.6 *TNF α*

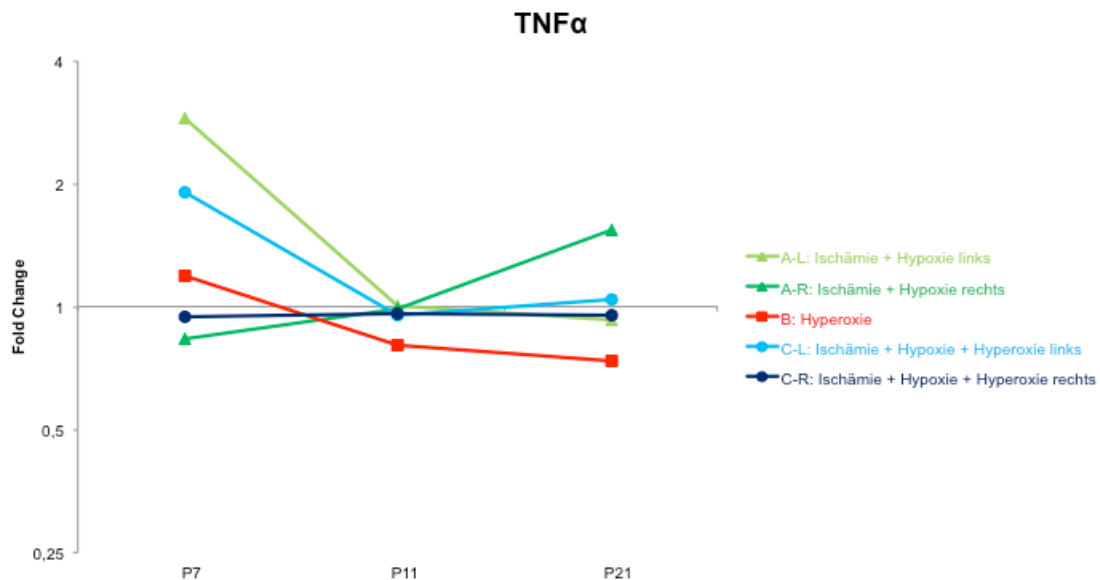


Abbildung 30: Expressionslevel *TNF α* für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21

P: postnataler Tag

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B: Hyperoxie

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D: Kontrollgruppe

Ischämie + Hypoxie links (A-L) zeigt einen deutlichen Abfall zwischen P7 (2,91) und P11 (1,00). Zwischen P11 und P21 bleibt A-L auf gleichem Niveau nahe der *baseline*. Ischämie + Hypoxie rechts (A-R) befindet sich an P7 und P11 nahe der *baseline*. An P21 kommt es zu einer Hochregulation auf 1,54. Das Expressionsniveau der Gruppe Hyperoxie (B) zeigt sich an P7 leicht über der *baseline*, fällt an P11 unter die *baseline* ab und bleibt auf dem gleichen Niveau bis P21. Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) zeigt ein ähnliches Muster wie Ischämie + Hypoxie links (A-L), einem deutlichen Abfall von 1,91 zwischen P7 und P11 auf 0,95. Zwischen P11 und P21 bleibt es auf gleichem Niveau nahe der *baseline*. Für Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) scheint es an keinem der Tage Veränderungen zu geben.

Die Ergebnisse der Tabelle 31 zeigen:

- Für *TNF α* eine Signifikanz für die Fragestellung Ischämie + Hypoxie-Effekt links versus rechts zwischen P7 und P21; der Wert von 1,29 bedeutet, dass der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert sich um ca. 1,3 verändert hatte von P7 zu P21 für Ischämie + Hypoxie links (A-L) zu Ischämie + Hypoxie rechts (A-R) bzw.

Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) zu Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) nach Intervention mit Ischämie + Hypoxie.

- Bei TNF α kann ein Trend (p=0,138) für Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11 gesehen werden.

In der Genexpressionsanalyse zeigen sich signifikante Veränderungen für TNF α bei der Fragestellung Ischämie + Hypoxie-Effekt links versus rechts zwischen P7 und P21, es gibt signifikante Veränderungen im Vergleich zwischen links und rechts für die Gruppen Ischämie + Hypoxie (A) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (C) in diesem Zeitraum. Bei TNF α scheint der Effekt von Hyperoxie in keinem Zeitraum eine bedeutendere Rolle auf die Expressionslevel zu spielen.

Tabelle 31: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 TNF α

TNF α	$\Delta\Delta\text{CT}$ mit KI	p
Effekt Hyperoxie P7 zu P11	0,71 (-0,68-2,10)	0,735
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,66 (-2,47-1,15)	0,936
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,09 (-1,47-1,29)	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,92 (-0,32-2,16)	0,288
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11	1,01 (-0,16-2,17)	0,138
Effekt Hyperoxie P7 zu P21	0,87 (-0,53-2,26)	0,511
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,82 (-2,63-0,99)	0,833
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,25 (-1,63-1,12)	0,999
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	1,04 (-0,20-2,27)	0,165
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P21	1,29 (0,12-2,45)	0,020 *
Effekt Hyperoxie P11 zu P21	0,16 (-1,23-1,54)	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	-0,16 (-1,96-1,66)	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,17 (-1,53-1,20)	1,000
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,11 (-1,12-1,35)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P11 zu P21	0,28 (-0,88-1,44)	0,994

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

3.3.7 VEGF-A164

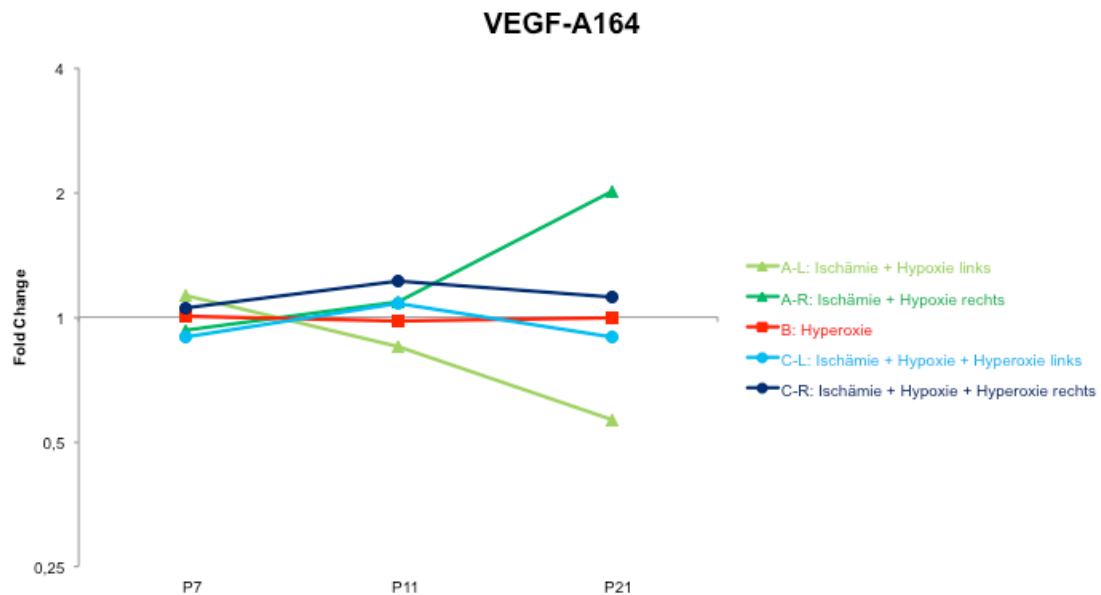


Abbildung 31: Expressionslevel VEGF-A164 für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21

P: postnataler Tag

A-L: Ischämie + Hypoxie links

A-R: Ischämie + Hypoxie rechts

B: Hyperoxie

C-L: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie links

C-R: Ischämie + Hypoxie + Hyperoxie rechts

D: Kontrollgruppe

Die Gruppe Ischämie + Hypoxie links (A-L) startet an P7 mit einem Expressionslevel von 1,23, fällt an P11 auf 0,85, um an P21 am tiefsten Punkt anzu- kommen (verglichen mit allen anderen Gruppen und Zeitpunkten) bei einem *fold change* von 0,57. Die Gruppe liegt an allen Tagen auf der *baseline*. Die Gruppe Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie links (C-L) und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) verhalten sich an P7, P11 und P21 parallel. Zwischen P7 und P11 kommt es zu einer Hochregulation, von P11 zu P21 zu einer Herunterregulation bei C-L auf 0,90 und bei Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie rechts (C-R) auf 1,12.

In Tabelle 32 ist für VEGF-A164 und Ischämie + Hypoxie links versus rechts zwischen P7 und P21 nur ein Trend erkennbar ($p=0,088$). Nicht signifikant sind die Daten zwischen P7 und P11, P7 und P21 sowie für die anderen Fragestel- lungen zwischen P11 und P21.

Tabelle 32: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 VEGF-A164

VEGF-A164	$\Delta\Delta\text{CT}$ mit KI	p
Effekt Hyperoxie P7 zu P11	-0,02 (-1,13-1,09)	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,30 (-1,75-1,15)	0,998
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,12 (-1,22-0,99)	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,14 (-0,85-1,14)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11	0,26 (-0,67-1,19)	0,985
Effekt Hyperoxie P7 zu P21	0,24 (-0,88-1,35)	0,997
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,27 (-1,72-1,19)	0,999
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,46 (-1,56-0,64)	0,877
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,40 (-0,58-1,39)	0,890
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P21	0,87 (-0,07-1,80)	0,088
Effekt Hyperoxie P11 zu P21	0,26 (-0,85-1,37)	0,995
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,04 (-1,40-1,48)	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,34 (-1,44-0,75)	0,970
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,26 (-0,73-1,25)	0,990
Ischämie + Hypoxie L-R P11 zu P21	0,60 (-0,32-1,53)	0,445

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

3.4 Einfluss des Geschlechts auf MBP-Score u. Genexpressionsanalyse

Für die MBP-Auswertung und in der Genexpressionsanalyse zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Geschlechtes (Originaldaten siehe Anhang Tabelle 42 bis Tabelle 46 im Anhang).

4 Diskussion

4.1 Mortalität im Rice-Vannucci-Modell

Mit einer Mortalitätsrate von ca. 25 % im vorliegenden Versuch lagen die Ergebnisse etwas über den Angaben von Rice et al., aber noch unter denen von Zhao et al., die höhere Mortalitätsraten hatten (Rice et al., 1981; Zhao et al., 2007; Zhao & Zuo, 2004). Verursacht wurde die erhöhte Mortalität wahrscheinlich durch die Art der Narkose und die Erholungsphase zwischen Operation und Hypoxie (unter 4.2 Komplikation Infarkt genauer ausgeführt).

Im vorliegenden Versuch starben die meisten Tiere während der Hypoxie-Behandlung (26 /151 Tieren (17,2 %)), damit lagen die Ergebnisse etwas über denen anderer Arbeitsgruppen, wo 6 bis 10 % in der Hypoxie-Behandlung starben (Hattori & Wasterlain, 1990; Trescher et al., 1997). Allerdings können zur Interaktion der Einzelfaktoren Überhang der Narkose, den Bedingungen in der Hypoxie, Temperatur in Hypoxie-Vorrichtung, Gas-Flow etc. keine Aussagen getroffen werden.

Letale Blutverluste waren mit 3,3 % (5/ 151 Tieren) die zweithäufigste Todesursache, damit lagen sie im Bereich, den andere Autoren mit 2 bis 6% angegeben hatten (Towfighi et al., 1995; Trescher et al., 1997).

Probleme mit der Narkose bzw. ihrer Antagonisierung traten immer wieder auf, vor allem aber im jungen Alter an P6, ca. 2,6 % insgesamt verstarben an Anästhesie-Komplikationen. Ca. 2 % der Tiere starben durch andere Ursachen (siehe Tabelle 25).

Generell lässt sich feststellen, dass viele Studien wenig oder keine Angaben zu Komplikationen, Mortalität und Todesursachen machen (Silverstein et al., 1984). Aus den Vorstudien von Gerstner et al. wurden ca. 20 % Ausfälle berichtet (persönliche Mitteilung B. Reich geb. Gerstner) (Gerstner et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit lag die Mortalität bei ca. 25 %, die damit die spärlichen Angaben in der Literatur leicht übertrifft. Zurückzuführen ist dies möglicherweise darauf, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Intervention einen Tag jünger waren als sonst in anderen Arbeitsgruppen (Back et al., 2002; Eklind et al., 2001; Follett et al., 2000; Hattori & Wasterlain, 1990; Jelinski et al., 1999; Rice et al., 1981; Trescher et al., 1997; Vannucci & Vannucci, 2005). Wir verwendeten P6-Ratten, da sie dem Frühgeborenen mit 29 SSW entsprechen, und PVL

meistens zwischen 23 und 32 SSW beim Menschen auftritt (Back et al., 2001; Back & Volpe, 1997; Workman et al., 2013).

Bedacht werden sollten außerdem die Möglichkeiten der Neben- und Wechselwirkungen der insgesamt 7 Substanzen, die für Narkose, Antagonisierung und Analgesie verwendeten wurden (siehe 4.2.2 Einfluss der Narkose auf die Infarktrate).

4.2 Komplikation Infarkt

Im vorliegenden Versuch hatten von den 19 operierten Tieren 11 einen Hirninfarkt (Infarktrate 58 %). In der Gruppe Ischämie + Hypoxie (Gruppe A) hatten 40 % und nach Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie (Gruppe C) hatten 78 % einen Infarkt. Zur Infarktrate finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben. Während im ursprünglichen Rice-Vannucci-Modell eine Infarktrate von 56 % beschrieben wurde, wurde die Infarktrate bei ähnlichem Versuchsaufbau von anderen Autoren als nicht existent beschrieben (Gerstner et al., 2009; Rice et al., 1981).

Die Infarktentscheidung wurde von Towfighi et al. sehr genau beschrieben. Bei 7 Tage alten Ratten nach Karotisligatur und Hypoxie traten bereits 2 Stunden danach mikroskopische Veränderungen auf. Auf der ipsilateralen Seite zur OP zeigte sich 8 bis 24 Stunden nach Ischämie + Hypoxie eine Schwellung der Hemisphäre. Im Zeitraum von 2 bis 4 Tagen nach Intervention kam es zur Verflüssigung und zum partiellen Kollaps der betroffenen Hemisphäre. Eine Woche nach Ischämie + Hypoxie hatte sich der Bereich des Infarktes zystisch verändert und enthielt loses granuläres Material. Die Region verwandelte sich 3 Wochen nach der Intervention in eine Höhle mit weichen Wänden, die häufig mit dem Seitenventrikel kommunizierte (Towfighi et al., 1995).

4.2.1 Einfluss des Alters der Tiere auf die Infarktrate

In der vorliegenden Arbeit hatten die Tiere mit einem starken Verlust von MBP oft auch in den HE-Auswertungen eine Verschmälerung der weißen Substanz. Außerdem ist festzustellen, dass die Tiere mit einem großen Schaden der grauen Substanz (z.B. einem Infarkt) schlechtere MBP-Scores hatten. Der Vorteil der Verwendung von P6-Ratten (wie im vorliegenden Versuch) im Rice-Vannucci-Modell wurde darin gesehen, dass es zu einer selektiven Schädigung der weißen Substanz kommen sollte (Choi et al., 2011; Gerstner et al., 2009).

P6-Ratten gleichen eher Frühgeborenen mit 29 SSW, einem Gestationsalter, dass im Prädilektionszeitraum für PVL beim Menschen liegt (Back et al., 2001; Back & Volpe, 1997; Workman et al., 2013).

Im vorliegenden Versuch traten entgegen dieser Annahme gehäuft Mitbeteiligungen des Kortex auf, was laut anderer Autoren altersbedingt sei. Towfighi et al. beschrieben einer Altersabhängigkeit für Grad und Region der Schädigung. Bei ihnen waren an P2-3 Schäden am Kortex seltener, während an P5 Kortex-Läsionen deutlich häufiger und stärker ausgeprägt war. Im höheren Alter war vor allem der Hippocampus von der Schädigung betroffen (Towfighi et al., 1997).

Die vorliegenden Erkenntnisse passen zur neueren Literatur, die entgegen älteren Annahmen beschreibt, dass je größer der Schaden der weißen Substanz sei, desto stärker sei auch die graue Substanz mitbetroffen sei (Choi et al., 2011; Gerstner et al., 2009; Selip et al., 2012).

Der altersabhängige Vorteil der P6-Ratten gegenüber den P7-Ratten im Bezug auf die Infarktrate wurde möglicherweise durch die Form der Narkose beeinflusst.

4.2.2 Einfluss der Narkose auf die Infarktrate

Im Vergleich zur Arbeit von Gerstner et al. fiel auf, dass die Infarktrate mit 58 % deutlich höher lag (Gerstner et al., 2009). Für diesen Sachverhalt spielte möglicherweise die Form der Anästhesie eine Rolle. In den Arbeitsgruppen von Gerstner und vielen anderen erfolgte die Narkose mit Äther, der inzwischen in Deutschland nicht mehr als alleiniges Narkotikum für Tierversuche zugelassen ist (Brunson, 2008; Follett et al., 2004; Follett et al., 2000; Gerstner et al., 2007; Manning et al., 2008; Otto, 2004).

Aufgrund von Tierschutzbestimmungen waren wir angehalten eine vollantagonisierbare Narkose durchzuführen. Die Nebenwirkungen dieser Narkose (Midazolam, Medetomidin und Fentanyl) und ihrer Antagonisierung (Flumazenil, Atipamezol und Naloxon) begünstigten möglicherweise eine Minderversorgung des Gehirns, was die Entstehung von Infarkten förderte. Die Medikamente sind teilweise direkt neurotoxisch, wie das verwendete Naloxon, welches den hypoxisch-ischämischen Schaden im Rice-Vannucci-Modell bei anderen Autoren verstärkte (Kofke et al., 1999; E. Ng et al., 2012; Young et al., 1984).

Möglicherweise spielten auch metabolische Prozesse, wie Hypoglykämien (durch Nahrungsentzug) während der Operation und Hypoxie eine Rolle. So hatten neonatale Ratten nach i.p.-Gabe von Glukose nach Karotisligatur ein reduziertes Infarktvolumen und eine bessere Gewichtsentwicklung (Hattori & Wasterlain, 1990). Eine schlechtere Gewichtsentwicklung nach Ischämie + Hypoxie konnte im vorliegenden Versuch beobachtet werden, wie die Daten in Tabelle 49 im Anhang zeigen. An P11 hatten die Tiere in der Kontrollgruppe das höchste Gewicht (Gruppe D, 18,66 g). Das zweithöchste Gewicht hatten die Tiere der Hyperoxie-Gruppe (Gruppe B, 18,14 g), gefolgt von der Ischämie + Hypoxie Gruppe (Gruppe A, 16,45 g). In der Gruppe mit Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie war das Gewicht am niedrigsten (Gruppe C, 15,41 g). In den Gruppen mit den Infarkten (C: 78 %, A: 40 %) war das Gewicht am niedrigsten, gefolgt von der Hyperoxie-Gruppe, so dass davon auszugehen ist, dass die jegliche Form der Schädigung, aber vor die Ischämie + Hypoxie zu einer schlechten Gewichtsentwicklung beigetragen hat.

4.2.3 Einfluss des zerebralen Blutfluss (CBF) auf die Infarktrate

Der Erfolg von Tiermodellen mit transitorischem oder permanentem Gefäßverschluss hängt davon ab, wie gut die Kollateralkreisläufe ausgeprägt sind (Liebeskind, 2012). Die unterschiedliche Ausprägung von Kollateralkreisläufen ist eine mögliche Erklärung für die sehr unterschiedlich ausgeprägten Schädigungen nach Ischämie + Hypoxie, wie sie auch im vorliegenden Versuch auftraten (Bonnin et al., 2011). Neben den Kollateralkreisläufen trug wahrscheinlich der Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes unter Hypoxie ebenfalls zur zerebralen Minderperfusion und Entstehung von Läsionen bei (Vannucci & Vannucci, 2005).

Durch die Karotisligatur kommt es zum reduzierten CBF, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von zerebralen Läsionen spielt. Alleinige Karotisligatur bei neonatalen Ratten reduzierte den CBF um ca. 20 %. Folgte dieser Intervention Hypoxie, lag die Minderperfusion bei 71 % (Silverstein et al., 1984). Während hypoxisch-ischämischer Intervention änderte sich der CBF regional im Gehirn. Der Blutfluss in der subkortikalen Substanz fiel am meisten ab, gefolgt vom Kortex, Striatum und Thalamus. Die Reihenfolge des reduzierten CBF korrelierte

deutlich mit der räumlichen Verteilung und Ausprägung der Schädigung (Vannucci et al., 1988).

Auch postinterventionell ist der CBF wichtig und aussagekräftig. Der 24 Stunden nach Intervention gemessene CBF korrelierte bei Ohshima et al. mit dem Schaden, der 7 Tage nach der Intervention erhoben wurde. Der CBF 24 Stunden nach Ischämie + Hypoxie kann somit als guter Parameter zur Vorhersage des zerebralen Schadens dienen (Ohshima et al., 2012).

Eine Ermittlung des CBF hätte möglicherweise im vorliegenden Versuch die erhöhte Infarktrate besser erklären können, aber als weitere Intervention sie auch erhöhen können.

4.2.4 Einfluss des Rattenstammes auf die Infarktrate

Im vorliegenden Versuch wurden wie bei Gerstner et al. Long-Evans-Ratten vom Wildtyp verwendet (Gerstner et al., 2009). Nach transientem Gefäßverschluss gibt es bei verschiedenen Rattenstämmen Unterschiede im CBF. Die auch im vorliegenden Versuch verwendeten Long Evans Ratten hatten den niedrigsten CBF nach der Intervention im Vergleich zu anderen Rattenstämmen (Prieto et al., 2005).

Zwischen den verschiedenen Rattenstämmen treten außerdem unterschiedliche Mortalitäten auf und die Orte der Schädigung im Gehirn nach gleicher Intervention variierten stark zwischen den verschiedenen Stämmen. Auch das motorische Defizit nach Intervention war sehr unterschiedlich ausgeprägt zwischen den einzelnen Zuchtformen (Kim et al., 2008).

Rice et al. und andere Autoren verwendeten im ursprünglichen Versuch und in Folgeversuchen Sprague-Dawley-Ratten (Back et al., 2002; Follett et al., 2004; Follett et al., 2000; Rice et al., 1981; Vannucci et al., 1988; Vannucci & Vannucci, 2005). Die von anderen Autoren verwendeten Wistar-Ratten erschienen im vorliegenden Versuch als ungeeignet, da für die Augenuntersuchung von Tiere mit pigmentierter Retina benötigt wurden (Jelinski et al., 1999; Steck et al., 2015; Towfighi et al., 1997; Uehara et al., 1999). Des Weiteren sind Unterschiede bei der Anfälligkeit für Infarkte zwischen erwachsenen Wistar-, Long-Evans- und Sprague-Dawley-Ratten, aber auch zwischen verschiedenen Züchtern beschrieben (Ren et al., 2004).

Die im vorliegenden Versuch verwendeten Long-Evans-Ratten wurden von der Firma Janvier (Le Genest-St-Isle, Frankreich) bezogen, während Gerstner et al. ihre bei einem Züchter in den USA bezogen hatten, da die Versuche dort stattfanden (Gerstner et al., 2009). Diese Tatsache spielte möglicherweise eine weitere Rolle in Bezug auf die vermehrten Infarkte, da beschrieben ist, dass es zwischen verschiedenen Rattenstämmen von unterschiedlichen Händlern nennenswerte Differenzen zwischen den Größen der Infarkte nach Gefäßverschluss gibt (Oloff et al., 1997; Oloff, Weber, Eilon, et al., 1995; Oloff, Weber, Miyazaki, et al., 1995).

Auch innerhalb eines Rattenstammes gibt es große Unterschiede in der vaskulären Versorgung des Gehirns (Firbas et al., 1973). Ca. 83 % der Ratten hatten eine ähnliche Gefäßversorgung des Gehirns, die restlichen jedoch waren sehr variabel vaskularisiert, was für Versuche mit Gefäßverschlüssen eine große Rolle spielen kann (Fox et al., 1993).

Auch die Expression von Wachstumsfaktoren wie *Brain-derived neurotrophic factor* scheint je nach Rattenstamm unterschiedlich zu sein, was möglicherweise ein Erklärungsansatz ist, warum die Reaktion auf ischämische Intervention so unterschiedlich zwischen den verschiedenen Stämmen sein kann (Neeley et al., 2011a). Ähnliche Daten gibt es auch für Zytokine wie TNF α , die stammen jedoch von anderen Krankheitsbildern, sind aber möglicherweise übertragbar (Neeley et al., 2011b).

Die sehr variablen Ergebnisse innerhalb der Literatur und in der vorliegenden Arbeit sind möglicherweise erklärbar durch den deutlich niedrigeren CBF der Long-Evans Ratten nach der Intervention, die großen Unterschiede der Gefäßversorgung im Gehirn innerhalb eines Rattenstammes sowie die Unterschiede bei der Anfälligkeit für Infarkte zwischen den verschiedenen Rattenstämmen und unterschiedlichen Händlern (Firbas et al., 1973; Fox et al., 1993; Oloff et al., 1997; Oloff, Weber, Eilon, et al., 1995; Oloff, Weber, Miyazaki, et al., 1995; Prieto et al., 2005; Ren et al., 2004).

4.2.5 Einfluss der Erholungsphase und Hypoxie auf die Infarktrate

Die Dauer der Hypoxie von 60 Minuten bei 6 % Sauerstoff wurde nach der Vorstudie von Gerstner et al. sowie der Literatur, auf die sich ihre Arbeitsgruppe bezieht, gewählt (Follett et al., 2004; Follett et al., 2000; Gerstner et al., 2009).

Die Ergänzung der Ischämie durch Hypoxie spielt bei der Schädigung des Gehirnes eine maßgebliche Rolle, wie auch Uehara et al zeigten. Bei beidseitiger Karotisligatur ohne Hypoxie traten nur 9 % Infarkte auf, was nahelegt, dass nicht nur der Verschluss des Gefäßes, sondern die Hypoxie die Infarktrate maßgeblich beeinflusste (Uehara et al., 1999). Auch Trescher et al. bestätigten, dass die Hypoxie einen großen Einfluss auf die Entstehung von Infarkten hatte (Trescher et al., 1997). Die Dauer der Hypoxie spielte außerdem eine wichtige Rolle, da Hypoxien nach Karotisligatur bis zu einer Dauer von 45 Minuten zu keiner zerebralen Läsionen führte. Nach 60 Minuten Hypoxie hatten 25 % nicht-zystische Läsionen, erwartungsgemäß führten längere Phasen von Hypoxie bei mehr Tieren zu schweren Läsionen (Towfighi et al., 1991). Zur besseren Planung von Studien, wäre eine direkte Korrelation zwischen Dauer der Exposition und MBP-Schäden durch z. B. Selip et al. wünschenswert gewesen (Selip et al., 2012).

Die höhere Sterblichkeit während der Hypoxie-Behandlung im vorliegenden Versuch im Vergleich mit anderen, war unter anderem mit der Dauer der Hypoxie zu erklären (Hattori & Wasterlain, 1990; Trescher et al., 1997). Mehrere Autoren beschrieben dass mit längerer Dauer der Hypoxie auch die Sterblichkeit stieg (Eklind et al., 2001; Rice et al., 1981).

Im vorliegenden Versuch gab es aus Gründen der Praktikabilität nur eine kurze Erholungsphase zwischen Karotisligatur und Hypoxie. Möglicherweise erklärt dies auch die Unterschiede zu anderen Arbeitsgruppen, wo zwischen operativer Intervention und Hypoxie mindestens eine Stunde Erholungsphase für die Rattenwelpen eingeräumt wurde (Follett et al., 2004; Follett et al., 2000; Gerstner et al., 2009; Manning et al., 2008). Im Originalmodell von Rice und Vannucci waren es sogar 4 bis 8 Stunden Erholungsphase bei der Mutter (Rice et al., 1981). Der Mitentwickler des Rice-Vannucci-Modells selbst empfiehlt um die Variabilität der Gehirnschädigung zu vermindern, die Phase der Hypoxie 2 bis 4 Stunden nach der Karotisligatur zu beginnen, damit sich die Welpen erholen können (Vannucci & Vannucci, 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Literatur zwischen Karotisligatur und Hypoxie längere Pausen zur Erholung gelassen wurden und die nur kurze Phase im vorliegenden Versuch möglicherweise eine weitere Ursache für die erhöhte Infarktrate darstellt.

4.2.6 Einfluss der Körpertemperatur auf die Infarktrate

Die normale Körpertemperatur einer neonatalen Ratte liegt bei ca. +37 °C (Rice et al., 1981; Thoresen et al., 1996; Yager et al., 1993; Young et al., 1983). Im vorliegenden Projekt war diese niedriger, präoperativ wurde eine Temperatur im Mittelwert von 32,7 °C gemessen, unmittelbar postoperativ zeigte sich eine Temperatur von 33,1 °C (siehe Tabelle 47 im Anhang), was auf die Wärme-maßnahmen (Heizmatte und Wärmekissen) zurückzuführen ist.

Es wurde bewusst versucht eine Hypothermie zu verhindern, da es dabei zu einer Linksverschiebung der Sauerstoff-Dissoziationskurve kommt und Sauerstoff reduziert ans Gewebe abgegeben wird (Maier & Obladen, 2011; Schulman et al., 1998).

Dieser Temperaturanstieg postoperativ hat möglicherweise zu einer erhöhten Infarktrate beigetragen, da laut Literatur bei ansteigender Körper- und Gehirntemperatur durch erhöhte Umgebungstemperatur die Schwere der Schädigung des Gehirns nach ischämisch-hypoxischer Intervention zunimmt (McDonald et al., 1991). Erhöhte Körpertemperatur und intrazerebrale Temperatursteigerung werden als Verstärker der ischämischen Schädigung beschrieben (Busto et al., 1987; Morikawa et al., 1992).

Bei erwachsenen Ratten gilt eine Temperatur von unter +33 °C im Gehirn als neuroprotektiv (Busto et al., 1987; Minamisawa et al., 1990). Für das neonatale Rattenmodell konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Young et al., 1983). Zum Zeitpunkt des Einsatz der Hypothermie gibt es unterschiedliche Daten. Bei einigen Autoren hatte die Hypothermie nur während der Karotisligatur oder spätestens während der Hypoxie einen neuroprotektiven Effekt (Yager et al., 1993; Young et al., 1983). Andere Daten besagen, dass eine Hypothermie direkt im Anschluss an Ischämie + Hypoxie zu einer Reduktion des verwendeten Schaden-Scores führten (Thoresen et al., 1996).

In der vorliegenden Hypoxie-Einrichtung ist von großen Temperaturschwankungen auszugehen, da die Tiere per Wärmematte unter der gesamten Hypoxie-Einrichtung, aber auch ihre Körper direkt durch Wärmekissen gewärmt wurden. Dabei wird deutlich, dass verschiedene Faktoren zum Einfluss von Temperatur auf zerebrale ischämische Schäden zu bedenken sind. Schwere des Insults, Dauer und Höhe der Temperaturveränderungen nach der Ischämie und Zeitpunkt, zu dem der Schaden im Gehirn untersucht wird ergeben laut Tre-

scher et al. ein komplexes Zusammenspiel (Trescher et al., 1997). Dieses Erkenntnis erhält immer mehr Einzug in Studien, so fasste 2005 einer der Mitentwickler des Rice-Vannucci-Modells zusammen, dass die Körpertemperatur ein wichtiger Faktor für die Variabilität der Gehirnschädigung sei (Vannucci & Vannucci, 2005).

4.2.7 Fazit Komplikation Infarkt

Die höhere Mortalität und Morbidität (hier Infarkthäufigkeit) im hier beschriebenen Versuch hängt möglicherweise mit den Nebenwirkungen der Narkose mit Midazolam, Medetomidin und Fentanyl und ihrer Antagonisierung zusammen. Auch mögliche Hypoglykämien durch Intervention und Narkose sowie reduzierter CBF könnten die vermehrte Entstehung von Infarkten begünstigt haben. Auch denkbar sein könnte, dass der Rattenstamm und seine Herkunft einen Einfluss auf die zerebrale Gefäßversorgung und Kollateralbildung und die damit verbundene Reaktion auf Ischämien hatten.

Die gewünschte selektive Schädigung der weißen Substanz bei P6-Ratten (im Sinne einer PVL des Frühgeborenen) wurde im vorliegenden Versuch möglicherweise durch andere Faktoren verfälscht und es kam zu stärkeren Schäden als bei anderen Autoren (Choi et al., 2011; Gerstner et al., 2009).

Im vorliegenden Versuch begünstigten möglicherweise die nur kurzen Erholungsphasen zwischen Karotisligatur und Hypoxie die Entstehung schwerer zerebraler Läsionen. Denkbar wäre auch, dass in anderen Arbeitsgruppen mit weniger Infarkten aber gleicher Dauer der Hypoxie die neonatalen Ratten eher kühler gehalten wurden als in der vorliegenden Arbeit, wo es große Anstrengungen gab, die neonatalen Tiere warm zu halten, so dass möglicherweise hyperthermische Schädigungen auftraten. Somit ist davon auszugehen, dass die erhöhte Infarktrate des vorliegenden Versuches multifaktoriell bedingt ist.

4.3 Interpretation histologische Ergebnisse - MBP-Score

Hypothese: Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie haben einen Einfluss auf die Markscheidenausbildung durch die OL (MBP-Expression).

4.3.1 Schäden durch Ischämie + Hypoxie

Die vorliegenden Daten zeigen eine Verschiebung in Richtung höherer MBP-Scores (d.h. größerer Schädigung) in den Ischämie + Hypoxie-Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie auch schon viele Arbeitsgruppen vorher gezeigt hatten (Follett et al., 2000; Gerstner et al., 2009).

Die linken Seiten der Ischämie + Hypoxie-Gruppen waren gegenüber den rechten Seiten dieser Gruppen signifikant mehr geschädigt, aber auch im Vergleich zur Hyperoxie-Gruppe und der Kontrollgruppe. Dies bestätigt werden die Ergebnisse anderer Autoren, wo MBP nach Intervention mit Karotisligatur und Hypoxie im Vergleich zur Normoxie vermindert war (Cheng et al., 2015).

4.3.2 Schäden durch Hyperoxie

Die vorliegenden Daten, wo die Hyperoxie-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant geschädigt war, passen in den aktuellen Stand der Wissenschaft. Die vorliegende verminderte MBP-Expression durch Hyperoxie passt zu den *in vivo*-Daten in der Literatur (Brehmer et al., 2012; Gerstner et al., 2008; Hoeber et al., 2016; Vottier et al., 2011). Dort wurde auch gezeigt, dass *in vitro* Hyperoxie entwicklungsabhängige Apoptose bei unreifen OL und Prä-OL auslöst (Gerstner et al., 2006). Hyperoxie stört die Axon-Oligodendrozyten-Integrität (Ritter et al., 2013).

Interessant wäre das neurologische Langzeit-Outcome der Ratten gewesen, da verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass es bei Ratten nach Hyperoxie-Behandlung zu Verhaltensauffälligkeiten, Koordinationsproblemen und langfristigen kognitiven Einschränkungen kommt (Hoeber et al., 2016; Schmitz et al., 2012; Serdar et al., 2016).

Der vorliegende Versuch fand genau im Zeitintervall der Vulnerabilität gegenüber Sauerstoff statt, die auf die ersten 2 Lebenswochen der neonatalen Ratte beschränkt ist (Felderhoff-Mueser et al., 2004).

4.3.3 Schäden durch Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie

Der Unterschied nach Karotisligatur links + Hypoxie und Hyperoxie im Vergleich zu Kontrollgruppe und zu den Gegenseiten war, wie zu erwarten, signifikant. Die Ratten mit Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie hatten einen signifikant größeren zerebralen Schaden als die Ratten mit Hyperoxie alleine. Schon Hypoxie (ohne Karotisligatur) mit folgender Hyperoxie bei neonatalen Ratten führte zu einer schwereren Schädigung der weißen Substanz führte, als durch Hyperoxie alleine (Vottier et al., 2011). Auch im Vergleich zwischen Ischämie + Hypoxie und Ischämie + Hypoxie und Hyperoxie zeigte sich in den vorliegenden Daten ein Trend zu höherer Schädigung in der Gruppe mit der zusätzlichen Hyperoxie, was die Daten anderer Autoren bestätigen (Gill et al., 2008; Perez-Polo et al., 2011).

4.3.4 Schädigung der kontralateralen Seite nach Ischämie + Hypoxie

Die kontralateralen Hemisphären der Ischämie + Hypoxie-Gruppen zeigten signifikante Veränderungen im Vergleich mit denen der Kontrollgruppe, d. h. der Eingriff der Karotisligatur + Hypoxie hatte auf der kontralateralen Seite auch einen Effekt. Dies war im ursprünglichen Rice-Vannucci-Modell nicht beschrieben (Rice et al., 1981). In Folgestudien an neonatalen Mäusen trat eine verspätete Atrophie im kontralateralen Hippocampus und *Corpus callosum* auf (Shrivastava et al., 2012). Bei P6-Ratten war die kontralaterale Seite in der gleichen Region wie ipsilateral betroffen, jedoch weniger ausgeprägt (Ikonomidou et al., 1989).

Die vorliegenden Ergebnisse passen zu denen aus neuerer Literatur, die beschreibt, dass es auch kontralateral zu einer Schädigung in Form von Hypomyelinisierung kam (Falahati et al., 2013; Ikonomidou et al., 1989; Lee et al., 2016; Shrivastava et al., 2012). Diese Schädigung entstand möglicherweise durch die zusätzliche Hypoxie-Behandlung (Juliano et al., 2015). Chronische Hypoxie verhinderte genau wie eine Karotisligatur auch die Reifung von OL und verursachte eine Form der PVL (Back, Craig, et al., 2006; Ment et al., 1998; Weiss et al., 2004). Auch intermittierenden Hypoxien führten zu verminderter MBP-Expression, einer Hypomyelinisierung der weißen Substanz und zu bleibenden neurologischen Defiziten (Juliano et al., 2015).

Möglicherweise hatte Hypoxie alleine (je nach Lebenstag und Länge der Exposition) damit auch schon einen Effekt, der in der vorliegenden Arbeit aber nicht getrennt von Ischämie untersucht wurde. Auch der Einfluss der Narkotika sowie der Medikamente zur Antagonisierung (wie in 4.2.2 Einfluss der Narkose auf die Infarktrate beschrieben) sind mögliche Schädigungsfaktoren für die Gegenseite.

4.4 Interpretation Genexpressionsanalyse

Hypothese: Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie verändern die Genexpression von Epo-R, HIF-1 α , NOS-2, TNF α und VEGF-A164.

4.4.1 Epo-R

Epo-R ist der Rezeptor von Epo und wird im Gehirn im Hippocampus, Kortex, der *Capsula interna* und im Mittelhirn exprimiert (Digicaylioglu et al., 1995). Die Expressionslevel von Epo und Epo-R verlaufen im Laufe des Lebens gleichsinnig und sind essentiell für die frühe embryonale neurologische Entwicklung (Liu et al., 1997; Sanchez, Navarro, et al., 2009; Spandou et al., 2004; Tsai et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es an P7 zu einer Hochregulation von Epo-R nach Ischämie + Hypoxie in der linken Hemisphäre kam, die im Verlauf bis P21 abfiel. Dies passt zu den Daten von Spandou et al., die demonstrierten, dass es 24 Stunden nach Ischämie + Hypoxie zu einer massiven Hochregulation von Epo-R kam, während bei den Kontrollen Epo-R fast nicht messbar war (Spandou et al., 2004). Die Expression von Epo-R an Neuronen wird durch den vermehrten Anfall von NO bei Ischämien stimuliert (Z. Y. Chen et al., 2010). Auch Hypoxie führt zur Hochregulation von Epo-R (Sanchez, Fares, et al., 2009).

Bei erwachsenen Mäusen mit fokaler Ischämie kam es zu einer erhöhten Expression von Epo-R im Rand des zerebralen Infarktes (Bernaudin et al., 1999). Bei den neonatalen Ratten kam nach einer Ischämie zu einer Hochregulation von Epo-R, die nach 24 Stunden nicht mehr feststellbar war. Epo-R wurde vor allem in sich in Apoptose befindlichen Zellen in den ischämischen Bereichen gefunden. Es ist davon auszugehen, dass Epo-R eine große, jedoch transiente Rolle bei Schädigungen des Gehirns während der Entwicklung spielt (Wen et al., 2004).

4.4.2 *HIF-1 α*

Hypoxie aktiviert HIF-1 α und HIF-2 α , während Normoxie und Hyperoxie die Aktivität beider Transkriptionsfaktoren blockiert (Wellmann et al., 2014).

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für die Expression von HIF-1 α in allen Gruppen und an allen Untersuchungstagen waren in der vorliegenden Arbeit nur minimal verändert. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde HIF-1 α wahrscheinlich zu spät untersucht, nämlich frühestens 24 Stunden nach Intervention. Diese Annahme wird durch die Studie von Mu et al. bekräftigt, wo der Höhepunkt der Expression von HIF-1 α (und VEGF) 8 Stunden nach Intervention erreicht war. Nach 24 Stunden waren beide kaum noch nachweisbar (Mu et al., 2003). Auch andere Studien beschreiben einen ähnlichen zeitlichen Verlauf (Calvert et al., 2006; W. Chen et al., 2008; Van den Tweel et al., 2006).

Die Hochregulation von HIF-1 α und VEGF im Rice-Vannucci-Modell verläuft parallel zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, zum Hirnödem und zum Tod von Neuronen (W. Chen et al., 2008).

Im Rice-Vannucci-Modell zeigten Tiere, die kein HIF-1 α exprimieren konnten, eine größere zerebrale Schädigung als der Wildtyp (Sheldon et al., 2009). HIF-1 α scheint notwendig für die regelrechte Entwicklung des Gehirns zu sein (Mu et al., 2005). Der Beginn der postnatalen Myelinisierung des *Corpus callosum* (bei der Maus) fällt mit dem Ende der höchsten Aktivität der Angiogenese zusammen (Harb et al., 2013). MBP-Verlust kann durch Hypoxie entstehen und wird u.a. durch verspätete Differenzierung von OL-Vorläuferzellen erklärt. Neuere Studien zeigten, dass OL-Vorläuferzellen eine intrinsische HIF-Funktion haben, die dafür verantwortlich ist, dass die Angiogenese der weißen Substanz mit der Axon-Integrität und der Beginn der Myelinisierung gekoppelt werden. Kommt es zum Verlust dieser Funktion resultiert daraus eine insuffiziente Angiogenese des *Corpus callosum* und einer schwerer Verlust von Axonen (Yuen et al., 2014).

Hyperoxie führte in der neonatalen Niere zur verminderten Expression von HIF und zur gestörten Nephrogenese (Popescu et al., 2013). Somit wäre zu erwarten gewesen, dass es in der Hyperoxie-Gruppe zu einer verminderten HIF-Expression kommt. Wahrscheinlich wurde für diese Veränderung zu spät gemessen.

4.4.3 NOS-2

Durch Inflammation kann NOS-2 induziert werden (Geller et al., 1993; Lyons et al., 1992). Im Tierversuch konnte bei neonatalen Ratten gezeigt werden, dass es nach einer Hyperoxie zu einer Hochregulation der mRNA für NOS-2 kommt und vermehrt NOS-2-Proteine gebildet werden (Hoehn et al., 2003). Somit wäre eine Veränderung für die Hyperoxie-Gruppe zu erwarten gewesen, die im vorliegenden Versuch nicht auftrat.

Bei Hypoxie-Versuche mit neonatalen Ratten kam es zu einem Anstieg von NOS bereits 5 Stunden nach Exposition (Ezquer et al., 2006). Im Rice-Vannucci-Modell war NOS-2 mRNA zwischen 6 und 24 Stunden nach der Intervention im Rice-Vannucci-Modell hochreguliert und nach 48 Stunden wieder verschwunden (Ikeno et al., 2000). Möglicherweise wurde im hier beschriebenen Versuchsaufbau NOS-2 zu spät untersucht, da die Expression von NOS-2 in allen Gruppen und an allen Untersuchungstagen nur minimal verändert war.

Die NOS-2-Proteine und das schädigende Peroxynitrit sind länger nachweisbar als RNA (Ikeno et al., 2000; H.-Q. Wang et al., 2011). Möglicherweise wäre ein Westernblot im vorliegenden Versuch 24 Stunden nach Intervention sinnvoll gewesen. Bei Perez-Polo et al. ließ vor allem die Kombination mit Hyperoxie die Proteinkonzentration 3 Tage nach Intervention steigen. Im Verlauf fiel die Konzentration jedoch sowohl in der Hypoxie + Ischämie-Gruppe als auch der Hypoxie + Ischämie und Hyperoxie-Gruppe unter das Niveau der Kontrolle ab (Perez-Polo et al., 2011). NOS-2 spielt also eine frühe Rolle bei zerebraler Schädigung im Rahmen von PVL (Haynes et al., 2009).

In Zellkulturen kommt es durch Hypoxie zum Tod von Neuronen zur Induktion von NOS-2 und TNF α (Fernandez-Lopez et al., 2005). Auch in menschlichen Gehirnen wurde in PVL betroffenen Regionen vermehrt NOS-2 und TNF α nachgewiesen (Kadhim et al., 2006). NOS-2 unterstützt die NO-Produktion, NO schädigt sich entwickelnde OL durch Peroxynitrit (Baud, Li, et al., 2004; Haynes et al., 2003).

4.4.4 TNF α

Am modifizierten Rice-Vannucci-Modell tritt innerhalb von 48 Stunden nach der Intervention eine deutlich erhöhte TNF α - Expression auf (Bona et al., 1999; Van den Tweel et al., 2006).

Zu diesem Zeitfenster passen die Daten aus dem vorliegenden Versuch, wo sich bei TNF α ein signifikanter Anstieg für die Fragestellung Ischämie + Hypoxie links versus rechts zwischen P7 und P21 zeigte und einen Trend zwischen P7 und P11.

Bei Van den Tweel et al. traten diese Veränderungen auf beiden Gehirnseiten auf, obwohl nur auf einer Seite eine Karotisligatur durchgeführt wurde. Es kam jedoch auf der kontralateralen Seite nicht zu einem bleibenden histologischen Schaden. Hypoxie ohne Karotisligatur führte zur Expression von TNF α , hinterließ aber keinen langfristig nachweisbaren Schaden (Van den Tweel et al., 2006; Van den Tweel et al., 2002). Daraus lässt sich vermuten, dass Ischämie in Form der Karotisligatur der wichtigste pathogene Faktor zu sein scheint für die Expression von TNF α . Über TNF α ist bekannt, dass es die OL-Reifung aber auch ihren Tod beeinflusst (Cai et al., 2003; Pang et al., 2010).

4.4.5 VEGF-A164

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Angiogenese (Licht et al., 2015). Hypoxie spielt dabei eine physiologische Rolle im Gehirn und führt zur Hochregulation von HIF-1, das die VEGF-Expression und Freisetzung stimuliert und so zu einem verbessertem Überleben von kortikalen Neuronen führt (Li et al., 2005).

In den vorliegenden Daten zeigte sich ein Trend ($p=0,088$) für Gruppen mit Ischämie + Hypoxie in den ipsilateralen Gehirnhälften zu einer erhöhten Expression von VEGF-A164 zwischen P7 und P21. Wie auch bei den vorher beschriebenen Genen hatte VEGF-A164 den Höhepunkt der Expression 8 Stunden nach ischämischer oder hypoxischer Intervention und war nach 24 Stunden bereits wieder abgefallen (Mu et al., 2003).

Nach Ischämie + Hypoxie werden HIF-1 α und VEGF in endothelialen Zellen hochreguliert, sind beteiligt an der dadurch gestörten Blut-Hirn-Schranke und begünstigen die Entstehung eines Hirnödems (W. Chen et al., 2008). Ähnliche Mechanismen wurden in neuronalen Geweben nachgewiesen, die den Zelltod nach Ischämie + Hypoxie begünstigen (Kaur et al., 2006; Mu et al., 2003).

In der akuten Erholungsphase nach Ischämie + Hypoxie wird VEGF transient induziert und fördert die Reifung von Astrozyten aus glialen Vorläuferzellen und

die Proliferation von frühen und späten OL-Vorläufern. Es unterstützt so die Remodeling-Phase des Gehirns nach Schädigung (Bain et al., 2013).

Hohe Sauerstoffkonzentrationen hingegen führen zu verminderter VEGF-Expression (Hopf et al., 2005; Licht et al., 2015; Werdich et al., 2004). Die Gruppe um Licht et al. vermuten, dass die durch Hyperoxie verminderte VEGF-Expression ähnlich wie bei der ROP zu Obliteration von Gefäßen führt, in deren Folge es zu Nekrosen u.a. periventrikulär kommt, die sich dann als PVL zeigen können (Licht et al., 2015). Dieser Effekt für Hyperoxie konnte in der vorliegenden Arbeit für die Hyperoxie-Gruppe nicht nachgewiesen werden.

4.4.6 Einfluss des Geschlechtes auf zerebrale Schädigung

Hypothesen: Geschlechtszugehörigkeit hat einen Einfluss auf die Schädigungen durch Ischämie + Hypoxie und/ oder Hyperoxie und die MBP-Expression, sowie die Genexpression von Epo-R, HIF-1 α , NOS-2, TNF α und VEGF-A164.

Aus der klinischen Arbeit gibt es Hinweise, dass männliches Geschlecht ein Risikofaktor für schlechteres Outcome sein könnte (Deulofeut et al., 2007; Marlow et al., 2005; Reiss et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit zeigte keine geschlechtsabhängige Beeinflussung der Schädigung in den immunhistochemischen Untersuchungen, obwohl auch in einem Modell für hypoxisch-ischämische Gehirnschädigungen beobachtet wurde, dass bei neonatalen Ratten die männlichen Tiere empfindlicher sind (Nunez & McCarthy, 2003). Auch die Intervention mit Hypoxie führte bei anderen Autoren zu stärkerer Schädigung bei männlichen Tieren (Mayoral et al., 2009).

Für die Genexpressionsanalyse zeigte sich keine geschlechtsabhängige Beeinflussung der Schädigung. Dies war in Betracht gezogen worden, da nicht nur Geschlechtshormone selbst für die sexuelle Differenzierung des Gehirns verantwortlich waren. Noch vor Bildung und Reifung der Gonaden kam es bei Männchen und Weibchen zu einer unterschiedlichen Genexpression im Gehirn (Dewing et al., 2003).

4.5 Stärken und Schwächen der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit zeigt, dass die Schädigungen im Rice-Vannucci-Modell sehr variabel sein können, wie bereits in den Kapiteln 4.1 Mortalität im Rice-Vannucci-Modell und 4.2 Komplikation Infarkt ausgeführt.

Eine Stärke der vorliegenden Arbeit lag in einer verblindeten Auswertung des MBP-Scores. Intervention, Herstellung der histologischen Schritte und Mikroskopieren wurden durch eine Person durchgeführt, während die verblindete Bewertung durch eine unabhängige und nicht beteiligte Person an Fotos erfolgte.

In der Genexpressionsanalyse kann als Stärke die Herstellung von 3 cDNAs und die Messung in 2 qPCR-Läufen gesehen werden, da das Auftreten von Fehlern durch wiederholte Messungen an unterschiedlichen cDNAs der gleichen Probe vermindert werden konnte. Die gesamten Ergebnisse der Genexpressionsanalyse müssen vor dem Hintergrund gesehen werden, dass möglicherweise die Zeitpunkte nicht optimal gewählt wurden und dass z. B. bei Mäusen beobachtet wurde, dass die Anästhesie zur Euthanasie mit Midazolam/ Medetomidin/ Fentanyl (wie im vorliegenden Versuch verwendet) zu einer veränderter Genexpression führte (Staib-Lasazik et al., 2014). Damit ist die Narkoseform eine weitere Schwäche dieser Arbeit, neben den Faktoren Temperaturmanagement und Erholungsphasen zwischen Operation und Hypoxie.

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Ischämie, Hypoxie wie auch Hyperoxie zu Schädigungen des unreifen Gehirns führen. Eine große Stärke des Projektes (in dem diese Arbeit ein Teilprojekt war) ist die Verwendung eines Tiermodells für die beiden sauerstoffabhängigen Erkrankungen PVL und ROP, die auch im klinischen Kontext gemeinsam auftreten (Daten zu ROP (Steck, 2014; Steck et al., 2015)) (Horbar et al., 2012).

4.6 Klinische Bezüge und Ausblick

Nach Ischämie und Reperfusion kommt es zum vermehrten Anfall von freien Sauerstoffradikalen, dadurch wird im unreifen Gehirn die Entstehung einer PVL begünstigt (Volpe, 2001). Durch hypoxisch-ischämische Ereignisse wird im unreifen Gehirn vor allem die weiße Substanz geschädigt (Jelinski et al., 1999; Reddy et al., 1998; Uehara et al., 1999; Yue et al., 1997). Bei Frühgeborenen kann bereits eine geringgradige Ischämie zu fokalen nekrotischen Läsionen führen (Takashima et al., 1982). Sie manifestieren sich als PVL mit motorischen und intellektuellen Defiziten (Hack, Taylor, et al., 2000; Hack, Wilson-Costello, et al., 2000; Volpe, 2008; Wood et al., 2000).

Die zystische Form der PVL tritt mit 4 % inzwischen deutlich seltener bei VLBW-Kindern auf, die nicht-zystische Form mit 15 % steht aktuell mehr im Fokus (Inder et al., 2003). Die diffuse Schädigung der weißen Substanz und eine Reduktion der grauen Substanz ist häufig mit kognitiven Einschränkungen und Verhaltensauffälligkeiten assoziiert (Doyle & Anderson, 2010; Monson et al., 2016; Thompson et al., 2008; Woodward et al., 2006).

Die bei Frühgeborenen vorliegende Unreife des Gehirns gehört zu den entscheidenden Faktoren der perinatalen Gehirnschädigung gemeinsam mit Plazentainsuffizienz, Asphyxie unter Geburt und Entzündungsreaktionen (Baud et al., 1998; Dammann et al., 1998; De Felice et al., 2001; Grether et al., 1996; Inder & Volpe, 2000; Leviton et al., 1999; O'Shea et al., 1998; Perlman et al., 1996; Redline et al., 2000; Resch et al., 2000; Skrablin et al., 2008; Van Gelder-Hasker et al., 2003; Wu & Colford, 2000; Yoon et al., 2000; Zupan et al., 1996). Vor allem Ischämie und Inflammation sind beteiligt bei der Entstehung von PVL und sind nur bedingt kontrollierbar.

Von diesen Faktoren unterschieden werden müssen die beeinflussbaren und mit für PVL verantwortlichen Aspekte der Hypoxie, Hyperoxie und Hypokapnie sowie Hypothermie, Hypoglykämie, Azidose und Schock. Sie sind durch optimale Versorgung der Schwangeren, des Neugeborenen und auf der Intensivstation vermeidbar (Maier & Obladen, 2011). Intermittierende Hypoxien sind mit schlechterem neurologischen Outcome und erhöhter Inzidenz für ROP assoziiert (Di Fiore et al., 2010; Hunt et al., 2004; Martin et al., 2011; Pillekamp et al., 2007). Die Prävention des hypoxisch-ischämischen Ereignisses ist deshalb besser als jede Therapie (Kumral et al., 2012).

Neben Hypoxie + Ischämie spielen auch Hyperoxie und die Bildung von Sauerstoffradikalen im unreifen Gehirn eine wichtige Rolle in der Pathogenese der PVL (Felderhoff-Mueser et al., 2004; Gerstner et al., 2008). Auch klinisch ist bestätigt, dass Hyperoxie das Risiko PVL, BPD und ROP erhöht (Collins et al., 2001; Deuber & Terhaar, 2011; Saugstad, 2001). Durch das Vermeiden von Hyperoxie in der intensivmedizinischen Versorgung konnte die neonatale Morbidität gesenkt werden, vor allem für BPD und ROP, ohne dass dieses Vorgehen einen negativen Effekt auf das entwicklungsneurologische Outcome der Frühgeborenen hatte (Deulofeut et al., 2006; Deulofeut et al., 2007). Die Schwere der Schädigung der weißen Substanz durch Hyperoxie wird verstärkt, wenn der Hyperoxie eine Hypoxie vorausgegangen ist (Vottier et al., 2011).

Unter anderem vor diesem Hintergrund wird in den internationalen Leitlinien zur Neugeborenen-Reanimation die Verwendung von Raumluft und im Verlauf erst eine titrierte Gabe von Sauerstoff empfohlen (Davis et al., 2004; ILCOR, 2005; Perlman et al., 2015; Wyllie et al., 2015). Die Mortalität und das Risiko für eine schwere hypoxisch-ischämische Enzephalopathie konnte durch den Einsatz von Raumluft gesenkt werden (Saugstad et al., 2008). Durch den restriktiven Einsatz von Sauerstoff konnte die Inzidenz und Schwere der ROP gesenkt werden (Askie et al., 2009).

Im Rahmen mechanischer Beatmung kommt es bei 25 % der Frühgeborenen bereits auf dem Transport auf die neonatologische Intensivstation zu Hypokapnie und Hyperoxie (Tracy et al., 2004). Zur Prävention von perinatalen Hirnschädigungen ist es wichtig für Normoxie und Normokapnie zu sorgen (Giannakopoulou et al., 2004; Hatzidaki et al., 2009; Klinger et al., 2005; Murase & Ishida, 2005; Pappas et al., 2011; Resch et al., 2000; Shankaran et al., 2006; Wiswell et al., 1996).

In den letzten Jahren gab es zahlreiche Untersuchungen um die optimalen Sauerstoffsättigungsgrenzen festzulegen (Carlo et al., 2010; Saugstad & Aune, 2011; Schmidt et al., 2013; Tarnow-Mordi et al., 2016). Arterielle Sauerstoffsättigungsgrenzen zwischen 85 und 89 % führten zu einer verminderten ROP-Rate, aber einer erhöhten Mortalität (Carlo et al., 2010). In den USA und Kanada gab es im kombinierten Outcome Tod oder Entwicklungsverzögerung keinen Unterschied zwischen den Gruppen mit Sättigungsgrenzen zwischen 85 und 89 % und 91 und 95 % (Saugstad & Aune, 2011; Schmidt et al., 2013). In Australi-

en und Großbritannien gab es in der Gruppe mit den niedrigeren Sättigungsgrenzen 2 Jahre danach keine erhöhte Mortalität oder Rate an Behinderungen. Allerdings fand sich in der kombinierten Post-hoc-Analyse in der Gruppe mit den niedrigeren Sättigungsgrenzen ein erhöhtes Risiko für das kombinierte Outcome und Tod alleine (Tarnow-Mordi et al., 2016).

Bei den Frühgeborenen unter 29 SSW sind über 80 % von Apnoen, Bradykardien und Hypoxämien betroffen, die klinisch bedeutsam sind. Je unreifer die Kinder sind, desto häufiger treten diese Ereignisse auf (Henderson-Smart, 1981). Zentrale Apnoen treten bei der Mehrheit der Frühgeborenen auf und sind Zeichen ihrer Unreife. Hypoxie und Hyperoxie gelten u.a. als prädisponierende Faktoren (Pillekamp et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in diesem Tierversuch imitierte Wechsel von hypoxischen und hyperoxischen Phasen der klinischen Realität auf einer Frühgeborenen-Intensivstation entspricht. Die intensivmedizinische Behandlung von Frühgeborenen muss darauf abzielen, Phasen von Ischämie, Hypoxie und Hyperoxie soweit wie möglich zu vermeiden. Mit dieser Studie konnte in Einklang mit Ergebnissen anderer Studien gezeigt werden, dass Ischämie, Hypoxie wie auch Hyperoxie jeweils isoliert, vor allem aber in Kombination zu Schädigungen des unreifen Gehirns führen.

Zusammenfassung

Durch verbesserte intensivmedizinische Versorgung überleben inzwischen viele extrem frühgeborene Kinder. Ihre Morbidität rückt vermehrt in den Fokus. Periventrikuläre Leukomalazie (PVL), Frühgeborenenretinopathie (ROP) und andere Erkrankungen spielen eine wichtige Rolle für das Langzeit-Outcome. Der für die humane PVL typische Verlust der weißen Substanz in der periventrikulären Region kann durch ein Modell mit neonatalen Ratten imitiert werden.

Bei neonatalen Long-Evans-Ratten wurde am postnatalen Tag 6 (P6) eine einseitige Karotisligatur (Ischämie) durchgeführt. Danach wurden sie gegenüber unterschiedlichen hypoxischen und/ oder hyperoxischen Konditionen exponiert. Die Gehirne wurden *post mortem* an P7, P11 und P21 untersucht. Immunhistochemisch wurde an P11 die Myelin-Basis-Protein (MBP)-Expression analysiert, indem verblindet Schnitte des Gehirns mit einem definierten Score bewertet wurden. Eine Genexpressionsanalyse wurde für Epo-R (*erythropoietin receptor*), HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1, α subunit*), NOS-2 (*inducible nitric oxide synthase 2*), TNF α (*tumor necrosis factor α*) und VEGF-A164 (*vascular endothelial growth factor-A164*) an P7, P11 und P21 durchgeführt.

In der Histologie der Gehirne zeigte sich ein schädigender Effekt in den Gruppen mit Ischämie u. Hypoxie, sowohl ipsilateral als auch kontralateral. Zusätzliche Hyperoxie verstärkte die Schädigung. Das bedeutet, dass schwere hypoxisch-ischämische Ereignisse auch die Gegenseite in Mitleidenschaft zogen. Eine Exposition mit Hyperoxie führte zu einer milden beidseitigen Schädigung.

In der Genexpressionsanalyse zeigten sich generell milde Veränderungen: Es kam zu einer signifikanten Hochregulation von Epo-R ipsilateral der Ischämie + Hypoxie an P7, die im Verlauf über P11 und P21 kontinuierlich abfallend war. Auch bei TNF α kam es zu einer Hochregulation ipsilateral zur Ischämie + Hypoxie an P7, die im Verlauf bis P21 abfiel. Für VEGF-A164, HIF-1 α und NOS-2 konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden.

Mit dieser Studie konnte in Einklang mit Ergebnisse anderer Studien gezeigt werden, dass Ischämie, Hypoxie wie auch Hyperoxie jeweils isoliert, vor allem aber in Kombination zu Schädigungen des unreifen Gehirns führen.

Summary

Progress in neonatal care has helped to greatly increase the number of infants surviving extreme preterm birth, and the focus has turned from decreasing mortality to improving morbidity. Periventricular leukomalacia (PVL), retinopathy of prematurity (ROP) and other diseases play an important role in the long-term outcome of these children. White matter damage (loss of myeline basic protein (MBP)) in the periventricular region is typical of PVL in humans and can be simulated in neonatal rat using the Rice-Vannucci-method.

In this study neonatal Long-Evans rats underwent unilateral carotid ligation (UCL) inducing ischemic damage on postnatal day 6 (P6). Afterwards they were exposed to hypoxic and/ or hyperoxic conditions. Postmortem analysis of the brains was done on P7, P11 und P21. MBP damage severity was examined on P11 with immunohistochemical methods and a blinded viewer graded the brain slides using the MBP damage score.

On P7, P11 and P21 gene expression studies were done on the same tissue for the Epo-R (*erythropoietin receptor*), HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1, α subunit*), NOS-2 (*inducible nitric oxide synthase 2*), TNF α (*tumor necrosis factor α*) and VEGF-A164 (*vascular endothelial growth factor-A164*) genes.

The immunohistochemistry revealed significant damage in the UCL groups under hypoxia on the ipsilateral side as well as the contralateral side. Treatment with hyperoxic conditions also lead to mild bilateral white matter damage.

Gene expression analysis showed some mild changes. Epo-R was upregulated in UCL groups under hypoxia on the side of the induced ischemia and then decreased continuously until P21. There was also an upregulation for TNF α in the UCL groups under hypoxia on the ipsilateral side which returned to baseline levels by P21. No significant changes were detected in HIF-1 α , NOS-2 and VEGF-A164.

In this study, we could show that that ischemia, hypoxia and hyperoxia separately, but especially in combination damage the immature brain, which is in line with other observations made in the field.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	<i>Arteria</i>
Aa.	<i>Arteriae</i>
BMFZ	Biomedizinisches Forschungszentrum Marburg
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
C	Cytosin
CBF	<i>cerebral blood flow</i> ; zerebraler Blutfluss
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	<i>Diethyl Pyrocarbonate</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELBW	<i>extremely low birth weight</i> , Geburtsgewicht unter 1000 g
Epo	Erythropoetin
Epo-R	<i>erythropoetin receptor</i> ; <i>Erythropoetin Rezeptor</i>
FC	<i>fold change</i>
G	Guanin
G	Gauge
g	Schleuderzahl Zentrifuge; Angabe der Beschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung g
g	Gramm
GFP-Filter	<i>Green-Fluorescent-Protein-Filter</i>
GP	<i>Globus pallidus</i>
GSH	Glutathion in reduzierter Form
GSSG	Glutathion in oxidierte Form
GV-SOLAS	Society of Laboratory Animals/ Gesellschaft für Versuchstierkunde
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i>

HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
ICP	Infantile Zerebralparese
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i> , auch NOS-2
i.p.	intraperitoneal
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
LBW	<i>low birth weight</i> , Geburtsgewicht unter 2500 g
M	Molaremasse, 1 M = Molekulargewicht in Gramm je Liter
MBP	Myelin-Basis-Protein
mg	Milligramm
Min.	Minute
MIQE-Guidelines	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments-Guidelines</i>
mmHg	Millimeter Quecksilber-Säule
MOPS-Puffer	Puffer, der 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure enthält
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
N.	<i>Nervus</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>nitric oxide synthase</i> , NO-Synthase
NOS-2	auch iNOS
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anionen-Radikal
OH [·]	Hydroxyl-Radikal
OL	Oligodendrozyt
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OR	<i>Odds Ratio</i>
P	postnataler Tag/ Lebenstag
P	Putamen

PBS	„ <i>phosphate buffered saline</i> “ phosphatgepufferte Salzlösung
PBST	1xPBS, 0,1 % Triton X-100 und 1 % Ziegen serum
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Prä-OL/ Pre-OL	<i>pre-myelinating oligodendrocyte</i> , Prä-Oligodendrozyt/
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> , Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RLT-Puffer	Puffer aus dem Kit der Firma Qiagen, Hilden; Zusammensetzung nicht bekannt
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease; Enzym, das RNA abbaut
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies,
ROP	<i>Retinopathia praematurorum</i> , Frühgeborenenretinopathie
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies,
RPE-Puffer	Puffer aus dem Kit der Firma Qiagen, Hilden; Zusammensetzung nicht bekannt
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	<i>ribosomal-RNA</i>
RW1-Puffer	Puffer aus dem Kit der Firma Qiagen, Hilden; Zusammensetzung nicht bekannt
S2-Labor	Labor der Sicherheitsstufe 2
SDS	<i>Sodium dodecylsulfat</i> , Natriumlaurylsulfat
SDS	Standardabweichung
Sek.	Sekunde
SMI-99	<i>Sternberger Monoclonal Antibodies-99</i>
SRY-Gen	<i>sex determining region of Y-gene</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
SVZ	<i>dorsal cerebral subventricular zone</i>
T	Thymin

T	Thalamus
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UCL	<i>unilateral carotid ligation</i> , unilaterale Karotisligatur
VAA	vollständig antagonisierbare Anästhesie
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkung und Komplikationen von Sauerstoff bei Frühgeborenen ..	5
Abbildung 2: Übersicht über OL-Stadien, Antikörper-Markierungen und PVL-Risiko	9
Abbildung 3: Schema zystische und nicht-zystische PVL	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung zystische und nicht-zystische PVL	15
Abbildung 5: Vergleichende Aspekte der Gehirnwachstumskurven.....	20
Abbildung 6: Zeitpunkte für Karotisligatur und folgende Erkrankung	23
Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf.....	32
Abbildung 8: Anästhesie im Tierversuch	34
Abbildung 9: Messung der Körperkerntemperatur	37
Abbildung 10: Tuscheinjektion	37
Abbildung 11: Karotisligatur	40
Abbildung 12: Hypoxie-Phase	41
Abbildung 13: Hyperoxie-Phase	42
Abbildung 14: Paraformaldehyd-Perfusion (PFA-Perfusion).....	44
Abbildung 15: Gewinnung molekularbiologische Proben an P7	46
Abbildung 16: Nativer Objektträger (Gehirnscheiben in Weiß- und Grautönen).....	48
Abbildung 17: HE-Färbung (Gehirnscheiben in Rosa- und Lilatönen)	49
Abbildung 18: Bestimmung der korrekten Lokalisation	52
Abbildung 19: Kriterien für Auswahl der korrekten Region in HE-Färbung	53
Abbildung 20: MBP-Färbung	54
Abbildung 21: Beispiel Genotypisierung.....	67
Abbildung 22: Makroinfarkte vs. Mikroinfarkte	79
Abbildung 23: Mikroinfarkt.....	79
Abbildung 24: Beobachtete und erwartete MBP-Score-Häufigkeiten und -werte nach Interventionsgruppen.....	82
Abbildung 25: Übersicht über Mittelwerte des MBP-Score der verschiedenen Interventionsgruppen.....	84
Abbildung 26: Nachweis der RNA-Qualität	89
Abbildung 27: Expressionslevel Epo-R für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21	91

Abbildung 28: Expressionslevel HIF-1 α für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21	93
Abbildung 29: Expressionslevel NOS-2 für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21	94
Abbildung 30: Expressionslevel TNF α für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21	95
Abbildung 31: Expressionslevel VEGF-A164 für die Interventionsgruppen an P7, P11 und P21	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der ROP	8
Tabelle 2: Abkürzungen für Interventionsgruppen	30
Tabelle 3: Verdünnung VAA pro 10 g KG	33
Tabelle 4: Verdünnung VAA - Antagonisierung pro 10 g	35
Tabelle 5: Verdünnung Metamizol pro 10 g KG	35
Tabelle 6: Arzneimittel für Narkose, Operation und Augenuntersuchung	36
Tabelle 7: Chemikalien zur Herstellung von Lösungen	45
Tabelle 8: Substanzen für die histologischen Färbungen der Hirnschnitte	50
Tabelle 9: Herstellung der Block- und Inkubationslösungen für Gefrierschnitte und -färbungen	51
Tabelle 10: Verwendete Antikörper für immunhistologische Färbungen des Gehirns	51
Tabelle 11: Score für MBP-Färbung modifiziert nach Gerstner	56
Tabelle 12: Chemikalien zur Herstellung von Puffern	60
Tabelle 13: Reaktionsbedingungen für qPCR	62
Tabelle 14: Ansatz 10 µl	62
Tabelle 15: Verwendete Enzyme und Marker für Genexpressionsanalyse	63
Tabelle 16: Substanzen für RNA-Extraktion, Reverse Transkription, qPCR und Genotypisierung	63
Tabelle 17: Verwendete Primersequenzen	64
Tabelle 18: Berechnung fold change	65
Tabelle 19: PCR-Ansatz	66
Tabelle 20: Primer für Geschlechtsbestimmung	66
Tabelle 21: Verwendete Verbrauchsmaterialien	68
Tabelle 22: Verwendete Geräte	69
Tabelle 23: Entstehung der Interventionsgruppen aus zweifaktoriellen Design	71
Tabelle 24: Überlebensrate	77
Tabelle 25: Übersicht über Todesursachen	78
Tabelle 26: Übersicht Infarkte	78
Tabelle 27: Verteilung des MBP-Score nach Gruppen	80
Tabelle 28: Ergebnisse MBP-Score Interventionsgruppen im Vergleich zueinander	85

Tabelle 29: Einfluss von Interventionen auf MBP-Score mit Odds Ratio mit 95% KI und p-Wert	87
Tabelle 30: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 Epo-R	92
Tabelle 31: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 TNF α	96
Tabelle 32: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 VEGF-A164	98
Tabelle 33: MBP-Auswertung.....	VI
Tabelle 34: Auswertung deskriptive Statistik Epo-R.....	VII
Tabelle 35: Auswertung deskriptive Statistik HIF-1 α	VIII
Tabelle 36: Auswertung deskriptive Statistik NOS-2.....	VIII
Tabelle 37: Auswertung deskriptive Statistik TNF α	IX
Tabelle 38: Auswertung deskriptive Statistik VEGF-A164	IX
Tabelle 39: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 HIF-1 α	X
Tabelle 40: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 NOS-2.....	X
Tabelle 41: Fragestellung an MBP-Score mit Ergänzung des Geschlechtes.....	X
Tabelle 42: Einfluss von Interventionen Epo-R P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit.....	X
Tabelle 43: Einfluss von Interventionen HIF-1 α P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit.....	XI
Tabelle 44: Einfluss von Interventionen NOS-2 P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit.....	XII
Tabelle 45: Einfluss von Interventionen TNF α P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit.....	XII
Tabelle 46: Einfluss von Interventionen VEGF-A164 P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit.....	XIII
Tabelle 47: Übersicht Narkose P6.....	XIII
Tabelle 48: Übersicht Narkose P11.....	XIII
Tabelle 49: MW Gewicht nach Gruppe an P11	XV

Literaturverzeichnis

Adams-Chapman, I., Hansen, N. I., Stoll, B. J., & Higgins, R. (2008). Neurodevelopmental outcome of extremely low birth weight infants with posthemorrhagic hydrocephalus requiring shunt insertion. *Pediatrics*, 121(5), e1167-1177.

Agresti, A. (2012). Logistic Regression Models Using Cumulative Logits *Analysis of Ordinal Categorical Data* (2nd edition, p. 44-87): John Wiley & Sons, Inc.

Allred, E. N., Capone, A., Jr., Fraioli, A., Dammann, O., Droste, P., Duker, J., et al. (2014). Retinopathy of prematurity and brain damage in the very preterm newborn. *J aapos*, 18(3), 241-247.

Altman, D. I., Powers, W. J., Perlman, J. M., Herscovitch, P., Volpe, S. L., & Volpe, J. J. (1988). Cerebral blood flow requirement for brain viability in newborn infants is lower than in adults. *Ann Neurol*, 24(2), 218-226.

An International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity. (2005). The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol*, 123(7), 991-999.

Ando, M., Takashima, S., & Mito, T. (1988). Endotoxin, cerebral blood flow, amino acids and brain damage in young rabbits. *Brain Dev*, 10(6), 365-370.

Armanian, A. M., & Badiie, Z. (2012). Resuscitation of preterm newborns with low concentration oxygen versus high concentration oxygen. *J Res Pharm Pract*, 1(1), 25-29.

Askie, L. M., Henderson-Smart, D. J., & Ko, H. (2009). Restricted versus liberal oxygen exposure for preventing morbidity and mortality in preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*(1), Cd001077.

Back, S. A., Craig, A., Luo, N. L., Ren, J., Akundi, R. S., Ribeiro, I., et al. (2006). Protective effects of caffeine on chronic hypoxia-induced perinatal white matter injury. *Ann Neurol*, 60(6), 696-705.

Back, S. A., Gan, X., Li, Y., Rosenberg, P. A., & Volpe, J. J. (1998). Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci*, 18(16), 6241-6253.

Back, S. A., Han, B. H., Luo, N. L., Chricton, C. A., Xanthoudakis, S., Tam, J., et al. (2002). Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci*, 22(2), 455-463.

Back, S. A., Luo, N. L., Borenstein, N. S., Levine, J. M., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2001). Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*, 21(4), 1302-1312.

Back, S. A., Riddle, A., & Hohimer, A. R. (2006). Role of instrumented fetal sheep preparations in defining the pathogenesis of human periventricular white-matter injury. *J Child Neurol*, 21(7), 582-589.

Back, S. A., & Volpe, J. J. (1997). Cellular and molecular pathogenesis of periventricular white matter injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 3(1), 96-107.

Bain, J. M., Moore, L., Ren, Z., Simonishvili, S., & Levison, S. W. (2013). Vascular endothelial growth factors A and C are induced in the SVZ following neonatal hypoxia-ischemia and exert different effects on neonatal glial progenitors. *Transl Stroke Res*, 4(2), 158-170.

Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). Anatomic analysis of blood vessels in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. *Pediatr Res*, 56(1), 117-124.

Banker, B. Q., & Larroche, J. C. (1962). Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch Neurol*, 7, 386-410.

Banks, W. A., Kastin, A. J., & Gutierrez, E. G. (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett*, 179(1-2), 53-56.

Baud, O., Greene, A. E., Li, J., Wang, H., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci*, 24(7), 1531-1540.

Baud, O., Haynes, R. F., Wang, H., Folkert, R. D., Li, J., Volpe, J. J., et al. (2004). Developmental up-regulation of MnSOD in rat oligodendrocytes confers protection against oxidative injury. *Eur J Neurosci*, 20(1), 29-40.

Baud, O., Li, J., Zhang, Y., Neve, R. L., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2004). Nitric oxide-induced cell death in developing oligodendrocytes is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis-inducing factor translocation. *Eur J Neurosci*, 20(7), 1713-1726.

Baud, O., Ville, Y., Zupan, V., Boithias, C., Lacaze-Masmonteil, T., Gabilan, J. C., et al. (1998). Are neonatal brain lesions due to intrauterine infection related to mode of delivery? *Br J Obstet Gynaecol*, 105(1), 121-124.

Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81(2), 871-927.

Berghella, V. (2010). *Preterm Birth: Prevention and Management* (1st edition): Wiley-Blackwell

Bernaudo, M., Marti, H. H., Roussel, S., Divoux, D., Nouvelot, A., MacKenzie, E. T., et al. (1999). A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(6), 643-651.

Binder, S., Hill, K., Meinzen-Derr, J., Greenberg, J. M., & Narendran, V. (2011). Increasing VLBW deliveries at subspecialty perinatal centers via perinatal outreach. *Pediatrics*, 127(3), 487-493.

Bjorklund, L. J., Ingimarsson, J., Curstedt, T., John, J., Robertson, B., Werner, O., et al. (1997). Manual ventilation with a few large breaths at birth compromises the therapeutic effect of subsequent surfactant replacement in immature lambs. *Pediatr Res*, 42(3), 348-355.

Bona, E., Andersson, A. L., Blomgren, K., Gilland, E., Puka-Sundvall, M., Gustafson, K., et al. (1999). Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res*, 45(4 Pt 1), 500-509.

Bonnin, P., Leger, P. L., Deroide, N., Fau, S., Baud, O., Pocard, M., et al. (2011). Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J Neurosci Methods*, 198(1), 103-109.

Borch, K., & Greisen, G. (1998). Blood flow distribution in the normal human preterm brain. *Pediatr Res*, 43(1), 28-33.

Brehmer, F., Bendix, I., Prager, S., van de Looij, Y., Reinboth, B. S., Zimmermanns, J., et al. (2012). Interaction of inflammation and hyperoxia in a rat model of neonatal white matter damage. *PLoS One*, 7(11), e49023.

Brunson, D. B. (2008). Chapter 3 - Pharmacology of Inhalation Anesthetics A2 - Fish, Richard E. In M. J. Brown, P. J. Danneman & A. Z. Karas (Eds.), *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals* (2nd edition, p. 83-95). San Diego: Academic Press.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4), 611-622.

Busto, R., Dietrich, W. D., Globus, M. Y., Valdes, I., Scheinberg, P., & Ginsberg, M. D. (1987). Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 7(6), 729-738.

Cai, Z., Pang, Y., Lin, S., & Rhodes, P. G. (2003). Differential roles of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res*, 975(1-2), 37-47.

Calvert, J. W., Cahill, J., Yamaguchi-Okada, M., & Zhang, J. H. (2006). Oxygen treatment after experimental hypoxia-ischemia in neonatal rats alters the expression of HIF-1 α and its downstream target genes. *J Appl Physiol* (1985), 101(3), 853-865.

Carlo, W. A., Finer, N. N., Walsh, M. C., Rich, W., Gantz, M. G., Laptook, A. R., et al. (2010). Target ranges of oxygen saturation in extremely preterm infants. *N Engl J Med*, 362(21), 1959-1969.

Castillo, A., Sola, A., Baquero, H., Neira, F., Alvis, R., Deulofeut, R., et al. (2008). Pulse oxygen saturation levels and arterial oxygen tension values in newborns receiving oxygen therapy in the neonatal intensive care unit: is 85% to 93% an acceptable range? *Pediatrics*, 121(5), 882-889.

Chan, K., Ohlsson, A., Synnes, A., Lee, D. S., Chien, L. Y., & Lee, S. K. (2001). Survival, morbidity, and resource use of infants of 25 weeks' gestational age or less. *Am J Obstet Gynecol*, 185(1), 220-226.

Charriaut-Marlangue, C., Bonnin, P., Leger, P. L., & Renolleau, S. (2013). Brief update on hemodynamic responses in animal models of neonatal stroke and hypoxia-ischemia. *Exp Neurol*, 248, 316-320.

Chen, W., Jadhav, V., Tang, J., & Zhang, J. H. (2008). HIF-1 α inhibition ameliorates neonatal brain injury in a rat pup hypoxic-ischemic model. *Neurobiol Dis*, 31(3), 433-441.

Chen, Z. Y., Wang, L., Asavaritkrai, P., & Noguchi, C. T. (2010). Up-regulation of erythropoietin receptor by nitric oxide mediates hypoxia preconditioning. *J Neurosci Res*, 88(14), 3180-3188.

Cheng, T., Xue, X., & Fu, J. (2015). Effect of OLIG1 on the development of oligodendrocytes and myelination in a neonatal rat PVL model induced by hypoxia-ischemia. *Mol Med Rep*, 11(4), 2379-2386.

Chidlow, G., Holman, M. C., Wood, J. P., & Casson, R. J. (2010). Spatiotemporal characterization of optic nerve degeneration after chronic hypoperfusion in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(3), 1483-1497.

Choi, E. K., Park, D., Kim, T. K., Lee, S. H., Bae, D. K., Yang, G., et al. (2011). Animal models of periventricular leukomalacia. *Lab Anim Res*, 27(2), 77-84.

Clancy, B., Darlington, R. B., & Finlay, B. L. (2001). Translating developmental time across mammalian species. *J Neurosci*, 105(1), 7-17.

Clancy, B., Kersh, B., Hyde, J., Darlington, R. B., Anand, K. J., & Finlay, B. L. (2007). Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics*, 5(1), 79-94.

Coalson, J. J. (2003). Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol*, 8(1), 73-81.

Collins, M. P., Lorenz, J. M., Jetton, J. R., & Paneth, N. (2001). Hypocapnia and other ventilation-related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatr Res*, 50(6), 712-719.

Compernelle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., et al. (2002). Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med*, 8(7), 702-710.

Costeloe, K., Hennessy, E., Gibson, A. T., Marlow, N., & Wilkinson, A. R. (2000). The EPICure study: outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics*, 106(4), 659-671.

Cunningham, S., Fleck, B. W., Elton, R. A., & McIntosh, N. (1995). Transcutaneous oxygen levels in retinopathy of prematurity. *Lancet*, 346(8988), 1464-1465.

Cust, A. E., Darlow, B. A., & Donoghue, D. A. (2003). Outcomes for high risk New Zealand newborn infants in 1998-1999: a population based, national study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 88(1), F15-22.

D'Agostino, D. P., Putnam, R. W., & Dean, J. B. (2007). Superoxide (O_2^-) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. *J Neurophysiol*, 98(2), 1030-1041.

Dammann, O., Allred, E. N., & Veelken, N. (1998). Increased risk of spastic diplegia among very low birth weight children after preterm labor or prelabor rupture of membranes. *J Pediatr*, 132(3 Pt 1), 531-535.

Dammann, O., & Leviton, A. (1998). Infection remote from the brain, neonatal white matter damage, and cerebral palsy in the preterm infant. *Semin Pediatr Neurol*, 5(3), 190-201.

Davis, P. G., Tan, A., O'Donnell, C. P., & Schulze, A. (2004). Resuscitation of newborn infants with 100% oxygen or air: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 364(9442), 1329-1333.

Dawson, J. A., Kamlin, C. O., Vento, M., Wong, C., Cole, T. J., Donath, S. M., et al. (2010). Defining the reference range for oxygen saturation for infants after birth. *Pediatrics*, 125(6), e1340-1347.

Day, C. L., & Ryan, R. M. (2017). Bronchopulmonary dysplasia: new becomes old again! *Pediatr Res*, 81(1-2), 210-213.

De Felice, C., Toti, P., Laurini, R. N., Stumpo, M., Picciolini, E., Todros, T., et al. (2001). Early neonatal brain injury in histologic chorioamnionitis. *J Pediatr*, 138(1), 101-104.

Deuber, C., & Terhaar, M. (2011). Hyperoxia in very preterm infants: a systematic review of the literature. *J Perinat Neonatal Nurs*, 25(3), 268-274.

Deulofeut, R., Critz, A., Adams-Chapman, I., & Sola, A. (2006). Avoiding hyperoxia in infants ≤ 1250 g is associated with improved short- and long-term outcomes. *J Perinatol*, 26(11), 700-705.

Deulofeut, R., Dudell, G., & Sola, A. (2007). Treatment-by-gender effect when aiming to avoid hyperoxia in preterm infants in the NICU. *Acta Paediatr*, 96(7), 990-994.

Dewing, P., Shi, T., Horvath, S., & Vilain, E. (2003). Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*, 118(1-2), 82-90.

Di Fiore, J. M., Bloom, J. N., Orge, F., Schutt, A., Schluchter, M., Cheruvu, V. K., et al. (2010). A higher incidence of intermittent hypoxemic episodes is associated with severe retinopathy of prematurity. *J Pediatr*, 157(1), 69-73.

Di Lorenzo, M., Bass, J., & Krantis, A. (1995). Use of L-arginine in the treatment of experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 30(2), 235-240; discussion 240-231.

Di Lorenzo, M., & Krantis, A. (2001). Altered nitric oxide production in the premature gut may increase susceptibility to intestinal damage in necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 36(5), 700-705.

Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., et al. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*, 21(1), 15-23.

Dieni, S., Inder, T., Yoder, B., Briscoe, T., Camm, E., Egan, G., et al. (2004). The pattern of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(12), 1297-1309.

Digicaylioglu, M., Bichet, S., Marti, H. H., Wenger, R. H., Rivas, L. A., Bauer, C., et al. (1995). Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3717-3720.

Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3(1), 79-83.

Dommergues, M. A., Patkai, J., Renaud, J. C., Evrard, P., & Gressens, P. (2000). Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol*, 47(1), 54-63.

Doyle, L. W. (2001). Outcome at 5 years of age of children 23 to 27 weeks' gestation: refining the prognosis. *Pediatrics*, 108(1), 134-141.

Doyle, L. W., & Anderson, P. J. (2010). Adult outcome of extremely preterm infants. *Pediatrics*, 126(2), 342-351.

Duggan, P. J., Maalouf, E. F., Watts, T. L., Sullivan, M. H., Counsell, S. J., Allsop, J., et al. (2001). Intrauterine T-cell activation and increased proinflammatory cytokine concentrations in preterm infants with cerebral lesions. *Lancet*, 358(9294), 1699-1700.

Eklind, S., Mallard, C., Leverin, A. L., Gilland, E., Blomgren, K., Mattsby-Baltzer, I., et al. (2001). Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic-ischaemic injury. *Eur J Neurosci*, 13(6), 1101-1106.

Euro-Peristat-Project. (2014). The European Perinatal Health Report 2010.

Ezquer, M. E., Valdez, S. R., & Seltzer, A. M. (2006). Inflammatory responses of the substantia nigra after acute hypoxia in neonatal rats. *Exp Neurol*, 197(2), 391-398.

Falahati, S., Breu, M., Waickman, A. T., Phillips, A. W., Arauz, E. J., Snyder, S., et al. (2013). Ischemia-induced neuroinflammation is associated with disrupted development of oligodendrocyte progenitors in a model of periventricular leukomalacia. *Dev Neurosci*, 35(2-3), 182-196.

Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Sifringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., et al. (2004). Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiol Dis*, 17(2), 273-282.

Fernandez-Lopez, D., Martinez-Orgado, J., Casanova, I., Bonet, B., Leza, J. C., Lorenzo, P., et al. (2005). Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neurosci Methods*, 145(1-2), 205-212.

Ferriero, D. M. (2006). Can we define the pathogenesis of human periventricular white-matter injury using animal models? *J Child Neurol*, 21(7), 580-581.

Field, D., Draper, E. S., Fenton, A., Papiernik, E., Zeitlin, J., Blondel, B., et al. (2009). Rates of very preterm birth in Europe and neonatal mortality rates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 94(4), F253-256.

Firbas, W., Sinzinger, H., & Schlemmer, M. (1973). Über den Circulus arteriosus bei Ratte, Maus und Goldhamster. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2(3), 243-251.

Flynn, J. T., Bancalari, E., Snyder, E. S., Goldberg, R. N., Feuer, W., Cassady, J., et al. (1992). A cohort study of transcutaneous oxygen tension and the incidence and severity of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*, 326(16), 1050-1054.

Follett, P. L., Deng, W., Dai, W., Talos, D. M., Massillon, L. J., Rosenberg, P. A., et al. (2004). Glutamate receptor-mediated oligodendrocyte toxicity in periventricular leukomalacia: a protective role for topiramate. *J Neurosci*, 24(18), 4412-4420.

Follett, P. L., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., & Jensen, F. E. (2000). NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci*, 20(24), 9235-9241.

Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., et al. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 16(9), 4604-4613.

Fox, G., Gallacher, D., Shevde, S., Loftus, J., & Swayne, G. (1993). Anatomic variation of the middle cerebral artery in the Sprague-Dawley rat. *Stroke*, 24(12), 2087-2092; discussion 2092-2083.

Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Wang, S. C., et al. (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), 3491-3495.

Gerstner, B., Buhner, C., Rheinlander, C., Polley, O., Schuller, A., Berns, M., et al. (2006). Maturation-dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia. *J Neurosci Res*, 84(2), 306-315.

Gerstner, B., DeSilva, T. M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R. L., et al. (2008). Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *J Neurosci*, 28(5), 1236-1245.

Gerstner, B., Lee, J., DeSilva, T. M., Jensen, F. E., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2009). 17beta-estradiol protects against hypoxic/ischemic white matter damage in the neonatal rat brain. *J Neurosci Res*, 87(9), 2078-2086.

Gerstner, B., Sifringer, M., Dzierko, M., Schuller, A., Lee, J., Simons, S., et al. (2007). Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol*, 61(6), 562-573.

Giannakopoulou, C., Korakaki, E., Manoura, A., Bikouvarakis, S., Papageorgiou, M., Gourgiotis, D., et al. (2004). Significance of hypocarbia in the development of periventricular leukomalacia in preterm infants. *Pediatr Int*, 46(3), 268-273.

Gill, M. B., Bockhorst, K., Narayana, P., & Perez-Polo, J. R. (2008). Bax shuttling after neonatal hypoxia-ischemia: hyperoxia effects. *J Neurosci Res*, 86(16), 3584-3604.

Glass, H. C., Bonifacio, S. L., Chau, V., Glidden, D., Poskitt, K., Barkovich, A. J., et al. (2008). Recurrent postnatal infections are associated with progressive white matter injury in premature infants. *Pediatrics*, 122(2), 299-305.

Goodfellow, P. N., & Lovell-Badge, R. (1993). SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet*, 27, 71-92.

Grafe, M. R. (1994). Developmental changes in the sensitivity of the neonatal rat brain to hypoxic/ischemic injury. *Brain Res*, 653(1-2), 161-166.

Grether, J. K., Nelson, K. B., Emery, E. S., 3rd, & Cummins, S. K. (1996). Prenatal and perinatal factors and cerebral palsy in very low birth weight infants. *J Pediatr*, 128(3), 407-414.

Hack, M., & Fanaroff, A. A. (2000). Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s. *Semin Neonatol*, 5(2), 89-106.

Hack, M., Taylor, H. G., Klein, N., & Mercuri-Minich, N. (2000). Functional limitations and special health care needs of 10- to 14-year-old children weighing less than 750 grams at birth. *Pediatrics*, 106(3), 554-560.

Hack, M., Wilson-Costello, D., Friedman, H., Taylor, G. H., Schluchter, M., & Fanaroff, A. A. (2000). Neurodevelopment and predictors of outcomes of children with birth weights of less than 1000 g: 1992-1995. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 154(7), 725-731.

Hagberg, H., Peebles, D., & Mallard, C. (2002). Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8(1), 30-38.

Hagberg, H., Wilson, M. A., Matsushita, H., Zhu, C., Lange, M., Gustavsson, M., et al. (2004). PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *J Neurochem*, 90(5), 1068-1075.

Harb, R., Whiteus, C., Freitas, C., & Grutzendler, J. (2013). In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(1), 146-156.

Hardy, R., & Reynolds, R. (1991). Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development*, 111(4), 1061-1080.

Hartnett, M. E., & Penn, J. S. (2012). Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med*, 367(26), 2515-2526.

Hattori, H., & Wasterlain, C. G. (1990). Posthypoxic glucose supplement reduces hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Ann Neurol*, 28(2), 122-128.

Hatzidaki, E., Giahnakis, E., Maraka, S., Korakaki, E., Manoura, A., Saitakis, E., et al. (2009). Risk factors for periventricular leukomalacia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 88(1), 110-115.

Haynes, R. L., Baud, O., Li, J., Kinney, H. C., Volpe, J. J., & Folkerth, D. R. (2005). Oxidative and nitrative injury in periventricular leukomalacia: a review. *Brain Pathol*, 15(3), 225-233.

Haynes, R. L., Folkerth, R. D., Keefe, R. J., Sung, I., Swzeda, L. I., Rosenberg, P. A., et al. (2003). Nitrosative and oxidative injury to premyelinating oligodendrocytes in periventricular leukomalacia. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(5), 441-450.

Haynes, R. L., Folkerth, R. D., Trachtenberg, F. L., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2009). Nitrosative stress and inducible nitric oxide synthase expression in periventricular leukomalacia. *Acta Neuropathol*, 118(3), 391-399.

Hellwig-Bürgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, 94(5), 1561-1567.

Henderson-Smart, D. J. (1981). The effect of gestational age on the incidence and duration of recurrent apnoea in newborn babies. *Aust Paediatr J*, 17(4), 273-276.

Henke, J., & Erhardt, W. (2011). Speziespezifische Anästhesie: Nager. In J. Henke, W. Erhardt, J. Haberstroh, C. Baumgartner & S. Tacke (Eds.), *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen* (2. Ausgabe, S. 703-725). Stuttgart: Schattauer.

Hicks, S. P., Cavanaugh, M. C., & O'Brien, E. D. (1962). Effects of anoxia on the developing cerebral cortex in the rat. *Am J Pathol*, 40, 615-635.

Hoeber, D., Sifringer, M., van de Looij, Y., Herz, J., Sizonenko, S. V., Kempe, K., et al. (2016). Erythropoietin Restores Long-Term Neurocognitive Function Involving Mechanisms of Neuronal Plasticity in a Model of Hyperoxia-Induced Preterm Brain Injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 9247493.

Hoehn, T., Felderhoff-Mueser, U., Maschewski, K., Stadelmann, C., Sifringer, M., Bittigau, P., et al. (2003). Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain. *Pediatr Res*, 54(2), 179-184.

Hoekstra, R. E., Ferrara, T. B., Couser, R. J., Payne, N. R., & Connett, J. E. (2004). Survival and long-term neurodevelopmental outcome of extremely premature infants born at 23-26 weeks' gestational age at a tertiary center. *Pediatrics*, 113(1 Pt 1), e1-6.

Holzapfel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit*, 37(2), 120-126.

Hopf, H. W., Gibson, J. J., Angeles, A. P., Constant, J. S., Feng, J. J., Rollins, M. D., et al. (2005). Hyperoxia and angiogenesis. *Wound Repair Regen*, 13(6), 558-564.

Horbar, J. D., Carpenter, J. H., Badger, G. J., Kenny, M. J., Soll, R. F., Morrow, K. A., et al. (2012). Mortality and neonatal morbidity among infants 501 to 1500 grams from 2000 to 2009. *Pediatrics*, 129(6), 1019-1026.

Huang, H. M., Lin, S. A., Chang, Y. C., & Kuo, H. K. (2012). Correlation between periventricular leukomalacia and retinopathy of prematurity. *Eur J Ophthalmol*, 22(6), 980-984.

Hungerford, J., Stewart, A., & Hope, P. (1986). Ocular sequelae of preterm birth and their relation to ultrasound evidence of cerebral damage. *Br J Ophthalmol*, 70(6), 463-468.

Hunt, C. E., Corwin, M. J., Baird, T., Tinsley, L. R., Palmer, P., Ramanathan, R., et al. (2004). Cardiorespiratory events detected by home memory monitoring and one-year neurodevelopmental outcome. *J Pediatr*, 145(4), 465-471.

Iida, K., Takashima, S., & Ueda, K. (1995). Immunohistochemical study of myelination and oligodendrocyte in infants with periventricular leukomalacia. *Pediatr Neurol*, 13(4), 296-304.

Ikeda, T., Mishima, K., Yoshikawa, T., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Xia, Y. X., et al. (2001). Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behav Brain Res*, 118(1), 17-25.

Ikeno, S., Nagata, N., Yoshida, S., Takahashi, H., Kigawa, J., & Terakawa, N. (2000). Immature brain injury via peroxynitrite production induced by inducible nitric oxide synthase after hypoxia-ischemia in rats. *J Obstet Gynaecol Res*, 26(3), 227-234.

Ikonomidou, C., Mosinger, J. L., Salles, K. S., Labruyere, J., & Olney, J. W. (1989). Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J Neurosci*, 9(8), 2809-2818.

ILCOR. (2005). 2005 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. Part 7: Neonatal resuscitation. *Resuscitation*, 67(2-3), 293-303.

Imamura, T., Ariga, H., Kaneko, M., Watanabe, M., Shibukawa, Y., Fukuda, Y., et al. (2013). Neurodevelopmental outcomes of children with periventricular leukomalacia. *Pediatr Neonatol*, 54(6), 367-372.

Inder, T. E., Anderson, N. J., Spencer, C., Wells, S., & Volpe, J. J. (2003). White matter injury in the premature infant: a comparison between serial cranial sonographic and MR findings at term. *AJNR Am J Neuroradiol*, 24(5), 805-809.

Inder, T. E., Huppi, P. S., Warfield, S., Kikinis, R., Zientara, G. P., Barnes, P. D., et al. (1999). Periventricular white matter injury in the premature infant is followed by reduced cerebral cortical gray matter volume at term. *Ann Neurol*, 46(5), 755-760.

Inder, T. E., & Volpe, J. J. (2000). Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol*, 5(1), 3-16.

IQTIG. (2016). Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen - Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2015 1 Geburtshilfe.

Jandek, C., Kellner, U., Heimann, H., & Foerster, M. H. (2005). Koagulationstherapie bei Frühgeborenenretinopathie. *Der Ophthalmologe*, 102(1), 33-38.

Jansen, E. M., & Low, W. C. (1996). Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res*, 78(2), 189-194.

Jelinski, S. E., Yager, J. Y., & Juurlink, B. H. (1999). Preferential injury of oligodendroblasts by a short hypoxic-ischemic insult. *Brain Res*, 815(1), 150-153.

- Jobe, A. H., & Bancalari, E. (2001). Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*, 163(7), 1723-1729.
- Jorch, G., & Hübner, A. (2010). *Neonatologie Die Medizin des Früh- und Reifgeborenen*. Stuttgart: Thieme.
- Juliano, C., Sosunov, S., Niatetskaya, Z., Isler, J. A., Utkina-Sosunova, I., Jang, I., et al. (2015). Mild intermittent hypoxemia in neonatal mice causes permanent neurofunctional deficit and white matter hypomyelination. *Exp Neurol*, 264, 33-42.
- Kadhim, H., Khalifa, M., Deltenre, P., Casimir, G., & Sebire, G. (2006). Molecular mechanisms of cell death in periventricular leukomalacia. *Neurology*, 67(2), 293-299.
- Kadhim, H., Tabarki, B., Verellen, G., De Prez, C., Rona, A. M., & Sebire, G. (2001). Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*, 56(10), 1278-1284.
- Kapadia, V. S., Chalak, L. F., Sparks, J. E., Allen, J. R., Savani, R. C., & Wyckoff, M. H. (2013). Resuscitation of preterm neonates with limited versus high oxygen strategy. *Pediatrics*, 132(6), e1488-1496.
- Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, 73(7), 751-762.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Ang, L. S., & Sundaresan, A. (2006). Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. *J Neurochem*, 98(4), 1200-1216.
- Khwaja, O., & Volpe, J. J. (2008). Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 93(2), F153-161.
- Kim, S. K., Cho, K. O., & Kim, S. Y. (2008). White Matter Damage and Hippocampal Neurodegeneration Induced by Permanent Bilateral Occlusion of Common Carotid Artery in the Rat: Comparison between Wistar and Sprague-Dawley Strain. *Korean J Physiol Pharmacol*, 12(3), 89-94.
- Kinney, H. C., Haynes, R. L., & Folkerth, R. D. (2004). White matter lesions in the perinatal period. In J. Golden & B. Harding (Eds.), *Neuropathology* (1st). Basel: ISN.
- Kinney, H. C., Panigrahy, A., Newburger, J. W., Jonas, R. A., & Sleeper, L. A. (2005). Hypoxic-ischemic brain injury in infants with congenital heart disease dying after cardiac surgery. *Acta Neuropathol*, 110(6), 563-578.
- Klinger, G., Beyene, J., Shah, P., & Perlman, M. (2005). Do hyperoxaemia and hypocapnia add to the risk of brain injury after intrapartum asphyxia? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 90(1), F49-52.

Kofke, W. A., Garman, R. H., Garman, R., & Rose, M. E. (1999). Opioid neurotoxicity: fentanyl-induced exacerbation of cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 818(2), 326-334.

Kojima, T., Ueda, Y., Sato, A., Sameshima, H., & Ikenoue, T. (2013). Comprehensive gene expression analysis of cerebral cortices from mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(2), 320-327.

Kuban, K. C., Allred, E. N., O'Shea, T. M., Paneth, N., Pagano, M., Dammann, O., et al. (2009). Cranial ultrasound lesions in the NICU predict cerebral palsy at age 2 years in children born at extremely low gestational age. *J Child Neurol*, 24(1), 63-72.

Kuban, K. C., & Gilles, F. H. (1985). Human telencephalic angiogenesis. *Ann Neurol*, 17(6), 539-548.

Kuhnert, M., Seelbach-Goebel, B., & Butterwegge, M. (1998). Predictive agreement between the fetal arterial oxygen saturation and fetal scalp pH: results of the German multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*, 178(2), 330-335.

Kumral, A., Tuzun, F., Ozbal, S., Ugur Ergur, B., Yilmaz, O., Duman, N., et al. (2012). Lipopolysaccharide-preconditioning protects against endotoxin-induced white matter injury in the neonatal rat brain. *Brain Res*, 1489, 81-89.

Kwak, D. J., Kwak, S. D., & Gauda, E. B. (2006). The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatr Res*, 60(4), 371-376.

Lassus, P., Ristimäki, A., Ylikorkala, O., Viinikka, L., & Andersson, S. (1999). Vascular endothelial growth factor in human preterm lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 159(5 Pt 1), 1429-1433.

Lassus, P., Turanlahti, M., Heikkilä, P., Andersson, L. C., Nupponen, I., Sarnesto, A., et al. (2001). Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Respir Crit Care Med*, 164(10 Pt 1), 1981-1987.

Ledebt, A., Savelsbergh, G. J., Sie, L. T., & van der Knaap, M. S. (2008). Walking and periventricular leukomalacia: locomotor characteristics and brain imaging (MRI). *Infant Behav Dev*, 31(4), 655-664.

Lee, H. J., Koh, S. H., Song, K. M., Seol, I. J., & Park, H. K. (2016). The Akt/mTOR/p70S6K Pathway Is Involved in the Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Hypoxic/Ischemic Brain Injury in a Neonatal Rat Model. *Neonatology*, 110(2), 93-100.

Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol*, 36, 1-17.

Leviton, A., & Dammann, O. (2004). Coagulation, inflammation, and the risk of neonatal white matter damage. *Pediatr Res*, 55(4), 541-545.

Leviton, A., & Gilles, F. H. (1984). Acquired perinatal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*, 16(1), 1-8.

Leviton, A., Paneth, N., Reuss, M. L., Susser, M., Allred, E. N., Dammann, O., et al. (1999). Maternal infection, fetal inflammatory response, and brain damage in very low birth weight infants. Developmental Epidemiology Network Investigators. *Pediatr Res*, 46(5), 566-575.

Li, D., Marks, J. D., Schumacker, P. T., Young, R. M., & Brorson, J. R. (2005). Physiological hypoxia promotes survival of cultured cortical neurons. *Eur J Neurosci*, 22(6), 1319-1326.

Licht, T., Dor-Wollman, T., Ben-Zvi, A., Rothe, G., & Keshet, E. (2015). Vessel maturation schedule determines vulnerability to neuronal injuries of prematurity. *J Clin Invest*, 125(3), 1319-1328.

Liebeskind, D. S. (2012). Collateral perfusion: time for novel paradigms in cerebral ischemia. *Int J Stroke*, 7(4), 309-310.

Liu, C., Shen, K., Liu, Z., & Noguchi, C. T. (1997). Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*, 272(51), 32395-32400.

Loscher, C. E., Donnelly, S., Lynch, M. A., & Mills, K. H. (2000). Induction of inflammatory cytokines in the brain following respiratory infection with Bordetella pertussis. *J Neuroimmunol*, 102(2), 172-181.

Lundstrom, K. E., Pryds, O., & Greisen, G. (1995). Oxygen at birth and prolonged cerebral vasoconstriction in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 73(2), F81-86.

Lyons, C. R., Orloff, G. J., & Cunningham, J. M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, 267(9), 6370-6374.

Maier, R. F., & Obladen, M. (2006). *Neugeborenenintensivmedizin Evidenz und Erfahrung* (7. Ausgabe). Berlin: Springer.

Maier, R. F., & Obladen, M. (2011). *Neugeborenenintensivmedizin Evidenz und Erfahrung* (8. Ausgabe). Berlin: Springer.

Manning, S. M., Talos, D. M., Zhou, C., Selip, D. B., Park, H. K., Park, C. J., et al. (2008). NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J Neurosci*, 28(26), 6670-6678.

Mariani, G., Dik, P. B., Ezquer, A., Aguirre, A., Esteban, M. L., Perez, C., et al. (2007). Pre-ductal and post-ductal O₂ saturation in healthy term neonates after birth. *J Pediatr*, 150(4), 418-421.

Markestad, T., Kaaresen, P. I., Ronnestad, A., Reigstad, H., Lossius, K., Medbo, S., et al. (2005). Early death, morbidity, and need of treatment among extremely premature infants. *Pediatrics*, 115(5), 1289-1298.

Marlow, N., Wolke, D., Bracewell, M. A., & Samara, M. (2005). Neurologic and developmental disability at six years of age after extremely preterm birth. *N Engl J Med*, 352(1), 9-19.

Marret, S., Marchand-Martin, L., Picaud, J.-C., Hascoët, J.-M., Arnaud, C., Rozé, J.-C., et al. (2013). Brain Injury in Very Preterm Children and Neurosensory and Cognitive Disabilities during Childhood: The EPIPAGE Cohort Study. *PLoS One*, 8(5), e62683.

Martin, R. J., Wang, K., Koroglu, O., Di Fiore, J., & Kc, P. (2011). Intermittent hypoxic episodes in preterm infants: do they matter? *Neonatology*, 100(3), 303-310.

Mayoral, S. R., Omar, G., & Penn, A. A. (2009). Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res*, 66(3), 248-253.

McDonald, J. W., Chen, C. K., Trescher, W. H., & Johnston, M. V. (1991). The severity of excitotoxic brain injury is dependent on brain temperature in immature rat. *Neurosci Lett*, 126(1), 83-86.

Menke, J., Michel, E., Hillebrand, S., von Twickel, J., & Jorch, G. (1997). Cross-spectral analysis of cerebral autoregulation dynamics in high risk preterm infants during the perinatal period. *Pediatr Res*, 42(5), 690-699.

Ment, L. R., Schwartz, M., Makuch, R. W., & Stewart, W. B. (1998). Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 111(2), 197-203.

Miller, M. J., Adams, J., Gu, X. A., Zhang, X. J., & Clark, D. A. (1990). Hemodynamic and permeability characteristics of acute experimental necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci*, 35(10), 1257-1264.

Minamisawa, H., Nordstrom, C. H., Smith, M. L., & Siesjo, B. K. (1990). The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10(3), 365-374.

Mishima, K., Ikeda, T., Aoo, N., Takai, N., Takahashi, S., Egashira, N., et al. (2005). Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neurosci Lett*, 376(3), 194-199.

Monson, B. B., Anderson, P. J., Matthews, L. G., Neil, J. J., Kapur, K., Cheong, J. L., et al. (2016). Examination of the Pattern of Growth of Cerebral Tissue Volumes From Hospital Discharge to Early Childhood in Very Preterm Infants. *JAMA Pediatr*, 170(8), 772-779.

Mori, H., Oikawa, M., Tamagami, T., Kumaki, H., Nakaune, R., Amano, J., et al. (2007). Oxidized proteins in astrocytes generated in a hyperbaric atmosphere induce neuronal apoptosis. *J Alzheimers Dis*, 11(2), 165-174.

Morikawa, E., Ginsberg, M. D., Dietrich, W. D., Duncan, R. C., Kraydieh, S., Globus, M. Y., et al. (1992). The significance of brain temperature in focal cerebral ischemia: histopathological consequences of middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12(3), 380-389.

Mu, D., Chang, Y. S., Vexler, Z. S., & Ferriero, D. M. (2005). Hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin upregulation with deferoxamine salvage after neonatal stroke. *Exp Neurol*, 195(2), 407-415.

Mu, D., Jiang, X., Sheldon, R. A., Fox, C. K., Hamrick, S. E., Vexler, Z. S., et al. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiol Dis*, 14(3), 524-534.

Murase, M., & Ishida, A. (2005). Early hypocarbia of preterm infants: its relationship to periventricular leukomalacia and cerebral palsy, and its perinatal risk factors. *Acta Paediatr*, 94(1), 85-91.

Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H. B., Hatori, K., Kobayashi, S., & Kim, S. U. (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60(4), 386-392.

Neeley, E. W., Berger, R., Koenig, J. I., & Leonard, S. (2011a). Prenatal stress differentially alters brain-derived neurotrophic factor expression and signaling across rat strains. *Neuroscience*, 187, 24-35.

Neeley, E. W., Berger, R., Koenig, J. I., & Leonard, S. (2011b). Strain dependent effects of prenatal stress on gene expression in the rat hippocampus. *Physiol Behav*, 104(2), 334-339.

Neu, J. (2005). The 'myth' of asphyxia and hypoxia-ischemia as primary causes of necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate*, 87(2), 97-98.

Ng, E., Taddio, A., & Ohlsson, A. (2012). Intravenous midazolam infusion for sedation of infants in the neonatal intensive care unit. *Cochrane Database Syst Rev*, 6, Cd002052.

Ng, Y. K., Fielder, A. R., Levene, M. I., Trounce, J. Q., & McLellan, N. (1989). Are severe acute retinopathy of prematurity and severe periventricular leucomalacia both ischaemic insults? *Br J Ophthalmol*, 73(2), 111-114.

Niermeyer, S., Kattwinkel, J., Van Reempts, P., Nadkarni, V., Phillips, B., Zideman, D., et al. (2000). International Guidelines for Neonatal Resuscitation: An excerpt from the Guidelines 2000 for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care: International Consensus on Science. Contributors and Reviewers for the Neonatal Resuscitation Guidelines. *Pediatrics*, 106(3), E29.

Northway, W. H., Jr., Rosan, R. C., & Porter, D. Y. (1967). Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med*, 276(7), 357-368.

Nowicki, P. T., & Nankervis, C. A. (1994). The role of the circulation in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*, 21(2), 219-234.

Nunez, J. L., & McCarthy, M. M. (2003). Sex differences and hormonal effects in a model of preterm infant brain injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1008, 281-284.

O'Shea, T. M., Klinepeter, K. L., Meis, P. J., & Dillard, R. G. (1998). Intrauterine infection and the risk of cerebral palsy in very low-birthweight infants. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 12(1), 72-83.

Ohshima, M., Tsuji, M., Taguchi, A., Kasahara, Y., & Ikeda, T. (2012). Cerebral blood flow during reperfusion predicts later brain damage in a mouse and a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Exp Neurol*, 233(1), 481-489.

Oliff, H. S., Coyle, P., & Weber, E. (1997). Rat strain and vendor differences in collateral anastomoses. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17(5), 571-576.

Oliff, H. S., Weber, E., Eilon, G., & Marek, P. (1995). The role of strain/vendor differences on the outcome of focal ischemia induced by intraluminal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*, 675(1-2), 20-26.

Oliff, H. S., Weber, E., Miyazaki, B., & Marek, P. (1995). Infarct volume varies with rat strain and vendor in focal cerebral ischemia induced by transcranial middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*, 699(2), 329-331.

Oskoui, M., Coutinho, F., Dykeman, J., Jette, N., & Pringsheim, T. (2013). An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*, 55(6), 509-519.

Otto, K. (2004). CHAPTER 34 - Anesthesia, Analgesia and Euthanasia A2 - Hedrich, Hans J. In G. Bullock (Hrsg.), *The Laboratory Mouse* (p. 555-569). London: Academic Press.

Pang, Y., Campbell, L., Zheng, B., Fan, L., Cai, Z., & Rhodes, P. (2010). Lipopolysaccharide-activated microglia induce death of oligodendrocyte progenitor cells and impede their development. *Neuroscience*, 166(2), 464-475.

Pappas, A., Shankaran, S., Laptook, A. R., Langer, J. C., Bara, R., Ehrenkranz, R. A., et al. (2011). Hypocarbica and adverse outcome in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr*, 158(5), 752-758.e751.

Pelken, L., & Maier, R. F. (2008). Risikofaktoren und Prävention der Retinopathia praematurorum. *Der Ophthalmologe*, 105(12), 1108-1114.

Perez-Polo, J. R., Reilly, C. B., & Rea, H. C. (2011). Oxygen resuscitation after hypoxia ischemia stimulates prostaglandin pathway in rat cortex. *Int J Dev Neurosci*, 29(6), 639-644.

Perlman, J. M., Risser, R., & Broyles, R. S. (1996). Bilateral cystic periventricular leukomalacia in the premature infant: associated risk factors. *Pediatrics*, 97(6 Pt 1), 822-827.

Perlman, J. M., Wyllie, J., Kattwinkel, J., Wyckoff, M. H., Aziz, K., Guinsburg, R., et al. (2015). Part 7: Neonatal Resuscitation: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation*, 132(16 Suppl 1), S204-241.

Petersen-Felix, S. (1998). Depth of anaesthesia. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 25(1), 4-7.

Pfaffl, M. W. (2004). Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 1(10), 92-95.

Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E., & Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol*, 3(6), 191-197.

Pillekamp, F., Hermann, C., Keller, T., von Gontard, A., Kribs, A., & Roth, B. (2007). Factors influencing apnea and bradycardia of prematurity - implications for neurodevelopment. *Neonatology*, 91(3), 155-161.

Popescu, C. R., Sutherland, M. R., Cloutier, A., Benoit, G., Bertagnolli, M., Zydorczyk, C., et al. (2013). Hyperoxia exposure impairs nephrogenesis in the neonatal rat: role of HIF-1alpha. *PLoS One*, 8(12), e82421.

Prieto, R., Carceller, F., Roda, J. M., & Avendano, C. (2005). The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neuro Res*, 27(1), 47-52.

R-Core-Team. (2015). R: a language and environment for statistical computing, from <http://www.R-project.org/>.

Rabi, Y., Singhal, N., & Nettel-Aguirre, A. (2011). Room-air versus oxygen administration for resuscitation of preterm infants: the ROAR study. *Pediatrics*, 128(2), e374-381.

Ramachandra, R., & Subramanian, T. (2011). *Atlas of the neonatal rat brain*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Rapp, M., Thyen, U., Müller-Steinhardt, K., & Kohl, M. (2005). Morbidität und Mortalität extrem frühgeborener Kinder in Schleswig-Holstein. [Morbidity and Mortality of Extremely Low Gestational Age Infants in Schleswig-Holstein]. *Z Geburtshilfe Neonatol*, 209(04), 135-143.

Reddy, K., Mallard, C., Guan, J., Marks, K., Bennet, L., Gunning, M., et al. (1998). Maturational change in the cortical response to hypoperfusion injury in the fetal sheep. *Pediatr Res*, 43(5), 674-682.

Redline, R. W., Wilson-Costello, D., Borawski, E., Fanaroff, A. A., & Hack, M. (2000). The relationship between placental and other perinatal risk factors for neurologic impairment in very low birth weight children. *Pediatr Res*, 47(6), 721-726.

- Reiss, A. L., Kesler, S. R., Vohr, B., Duncan, C. C., Katz, K. H., Pajot, S., et al. (2004). Sex differences in cerebral volumes of 8-year-olds born preterm. *J Pediatr*, 145(2), 242-249.
- Ren, Y., Hashimoto, M., Pulsinelli, W. A., & Nowak, T. S., Jr. (2004). Hypothermic protection in rat focal ischemia models: strain differences and relevance to "reperfusion injury". *J Cereb Blood Flow Metab*, 24(1), 42-53.
- Resch, B., Jammerneegg, A., Vollaard, E., Maurer, U., Mueller, W., & Pertl, B. (2004). Preterm twin gestation and cystic periventricular leucomalacia. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal Edition*, 89(4), F315-F320.
- Resch, B., Vollaard, E., Maurer, U., Haas, J., Rosegger, H., & Muller, W. (2000). Risk factors and determinants of neurodevelopmental outcome in cystic periventricular leucomalacia. *Eur J Pediatr*, 159(9), 663-670.
- Reynolds, R., & Hardy, R. (1997). Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J Neurosci Res*, 47(5), 455-470.
- Rice, J. E., 3rd, Vannucci, R. C., & Brierley, J. B. (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 9(2), 131-141.
- Risau, W., & Wolburg, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 13(5), 174-178.
- Ritter, J., Schmitz, T., Chew, L. J., Buhner, C., Mobius, W., Zonouzi, M., et al. (2013). Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. *J Neurosci*, 33(21), 8990-9002.
- Romero, R., Mazor, M., Sepulveda, W., Avila, C., Copeland, D., & Williams, J. (1992). Tumor necrosis factor in preterm and term labor. *Am J Obstet Gynecol*, 166(5), 1576-1587.
- Romijn, H. J., Hofman, M. A., & Gramsbergen, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev*, 26(1), 61-67.
- Rook, D., Schierbeek, H., Vento, M., Vlaardingerbroek, H., van der Eijk, A. C., Longini, M., et al. (2014). Resuscitation of preterm infants with different inspired oxygen fractions. *J Pediatr*, 164(6), 1322-1326.e1323.
- Rothwell, N. J., & Relton, J. K. (1993). Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischaemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 5(3), 178-198.
- Saija, A., Princi, P., Lanza, M., Scalese, M., Aramnejad, E., & De Sarro, A. (1995). Systemic cytokine administration can affect blood-brain barrier permeability in the rat. *Life Sci*, 56(10), 775-784.

Sanchez, P. E., Fares, R. P., Risso, J. J., Bonnet, C., Bouvard, S., Le-Cavorsin, M., et al. (2009). Optimal neuroprotection by erythropoietin requires elevated expression of its receptor in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(24), 9848-9853.

Sanchez, P. E., Navarro, F. P., Fares, R. P., Nadam, J., Georges, B., Moulin, C., et al. (2009). Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common beta chain expression in the rat brain throughout the life span. *J Comp Neurol*, 514(4), 403-414.

Saugstad, O. D. (2001). Chronic lung disease: oxygen dogma revisited. *Acta Paediatr*, 90(2), 113-115.

Saugstad, O. D., & Aune, D. (2011). In search of the optimal oxygen saturation for extremely low birth weight infants: a systematic review and meta-analysis. *Neonatology*, 100(1), 1-8.

Saugstad, O. D., Aune, D., Aguar, M., Kapadia, V., Finer, N., & Vento, M. (2014). Systematic review and meta-analysis of optimal initial fraction of oxygen levels in the delivery room at ≤ 32 weeks. *Acta Paediatr*, 103(7), 744-751.

Saugstad, O. D., Ramji, S., Soll, R. F., & Vento, M. (2008). Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: an updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology*, 94(3), 176-182.

Schlarman, J., & Galatsch, M. (2014). Regressionsmodelle für ordinale Zielvariablen. *GMS Med Inform Biom Epidemiol*, 10(1).

Schmidt, B., Whyte, R. K., Asztalos, E. V., Moddemann, D., Poets, C., Rabi, Y., et al. (2013). Effects of targeting higher vs lower arterial oxygen saturations on death or disability in extremely preterm infants: a randomized clinical trial. *Jama*, 309(20), 2111-2120.

Schmitz, T., Endesfelder, S., Reinert, M. C., Klinker, F., Muller, S., Buhrer, C., et al. (2012). Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol*, 235(1), 374-379.

Schulman, H., Laufer, L., Berginer, J., Hershkowitz, E., Berenstein, T., Sofer, S., et al. (1998). CT findings in neonatal hypothermia. *Pediatr Radiol*, 28(6), 414-417.

Selip, D. B., Jantzie, L. L., Chang, M., Jackson, M. C., Fitzgerald, E. C., Boll, G., et al. (2012). Regional differences in susceptibility to hypoxic-ischemic injury in the preterm brain: exploring the spectrum from white matter loss to selective grey matter injury in a rat model. *Neurol Res Int*, 2012, 725184.

Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16.

Serdar, M., Herz, J., Kempe, K., Lumpe, K., Reinboth, B. S., Sizonenko, S. V., et al. (2016). Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain Behav Immun*, 52, 106-119.

Shankaran, S., Langer, J. C., Kazzi, S. N., Laptook, A. R., & Walsh, M. (2006). Cumulative index of exposure to hypocarbia and hyperoxia as risk factors for periventricular leukomalacia in low birth weight infants. *Pediatrics*, 118(4), 1654-1659.

Shankaran, S., Laptook, A. R., Ehrenkranz, R. A., Tyson, J. E., McDonald, S. A., Donovan, E. F., et al. (2005). Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med*, 353(15), 1574-1584.

Sheldon, R. A., Osredkar, D., Lee, C. L., Jiang, X., Mu, D., & Ferriero, D. M. (2009). HIF-1 alpha-deficient mice have increased brain injury after neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci*, 31(5), 452-458.

Sheldon, R. A., Sedik, C., & Ferriero, D. M. (1998). Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain Res*, 810(1-2), 114-122.

Shennan, A. T., Dunn, M. S., Ohlsson, A., Lennox, K., & Hoskins, E. M. (1988). Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics*, 82(4), 527-532.

Sherlock, R. L., Anderson, P. J., & Doyle, L. W. (2005). Neurodevelopmental sequelae of intraventricular haemorrhage at 8 years of age in a regional cohort of ELBW/very preterm infants. *Early Hum Dev*, 81(11), 909-916.

Shrivastava, K., Chertoff, M., Llovera, G., Recasens, M., & Acarin, L. (2012). Short and long-term analysis and comparison of neurodegeneration and inflammatory cell response in the ipsilateral and contralateral hemisphere of the neonatal mouse brain after hypoxia/ischemia. *Neurol Res Int*, 2012, 781512.

Silbereis, J. C., Huang, E. J., Back, S. A., & Rowitch, D. H. (2010). Towards improved animal models of neonatal white matter injury associated with cerebral palsy. *Dis Model Mech*, 3(11-12), 678-688.

Silverstein, F., Buchanan, K., & Johnston, M. V. (1984). Pathogenesis of hypoxic-ischemic brain injury in a perinatal rodent model. *Neurosci Lett*, 49(3), 271-277.

Skrablin, S., Maurac, I., Banovic, V., & Bosnjak-Nadj, K. (2008). Perinatal factors associated with the neurologic impairment of children born preterm. *Int J Gynaecol Obstet*, 102(1), 12-18.

Soothill, P. W., Nicolaides, K. H., Rodeck, C. H., & Gamsu, H. (1986). Blood gases and acid-base status of the human second-trimester fetus. *Obstet Gynecol*, 68(2), 173-176.

Soul, J. S., Hammer, P. E., Tsuji, M., Saul, J. P., Bassan, H., Limperopoulos, C., et al. (2007). Fluctuating pressure-passivity is common in the cerebral circulation of sick premature infants. *Pediatr Res*, 61(4), 467-473.

Spandou, E., Papoutsopoulou, S., Soubasi, V., Karkavelas, G., Simeonidou, C., Kremenopoulos, G., et al. (2004). Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Res*, 1021(2), 167-172.

Staib-Lasarezik, I., Kriege, O., Timaru-Kast, R., Pieter, D., Werner, C., Engelhard, K., et al. (2014). Anesthesia for euthanasia influences mRNA expression in healthy mice and after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 31(19), 1664-1671.

Steck, J. (2014). *Netzhautgefäßpathologien in einem Rattenmodell für periventrikuläre Leukomalazie – ein neues Modell für die Frühgeborenenretinopathie beim Menschen?*, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.

Steck, J., Bluemel, C., Kampmann, S., Greene, B., Maier, R. F., Arnhold, S., et al. (2015). Retinal vessel pathologies in a rat model of periventricular leukomalacia: a new model for retinopathy of prematurity? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(3), 1830-1841.

Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*, 20(4), 327-348.

Stoll, B. J. (1994). Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol*, 21(2), 205-218.

Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., et al. (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 126(3), 443-456.

Swamy, G. K., Ostbye, T., & Skjaerven, R. (2008). Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *Jama*, 299(12), 1429-1436.

Takashima, S., Becker, L. E., & Chan, F. W. (1982). Retardation of neuronal maturation in premature infants compared with term infants of the same postconceptional age. *Pediatrics*, 69(1), 33-39.

Tarnow-Mordi, W., Stenson, B., Kirby, A., Juszczak, E., Donoghoe, M., Deshpande, S., et al. (2016). Outcomes of Two Trials of Oxygen-Saturation Targets in Preterm Infants. *N Engl J Med*, 374(8), 749-760.

The International Neonatal Network. (1993). The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. *The Lancet*, 342(8865), 193-198.

Thompson, D. K., Wood, S. J., Doyle, L. W., Warfield, S. K., Lodygensky, G. A., Anderson, P. J., et al. (2008). Neonate hippocampal volumes: prematurity, perinatal predictors, and 2-year outcome. *Ann Neurol*, 63(5), 642-651.

Thoresen, M., Bagenholm, R., Loberg, E. M., Apricena, F., & Kjellmer, I. (1996). Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 74(1), F3-9.

Tomimatsu, T., Fukuda, H., Endoh, M., Mu, J., Watanabe, N., Kohzuki, M., et al. (2002). Effects of neonatal hypoxic-ischemic brain injury on skilled motor tasks and brainstem function in adult rats. *Brain Res*, 926(1-2), 108-117.

Toth, B., Becker, A., & Seelbach-Gobel, B. (2002). Oxygen saturation in healthy newborn infants immediately after birth measured by pulse oximetry. *Arch Gynecol Obstet*, 266(2), 105-107.

Towfighi, J., Mauger, D., Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (1997). Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res*, 100(2), 149-160.

Towfighi, J., Yager, J. Y., Housman, C., & Vannucci, R. C. (1991). Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol*, 81(5), 578-587.

Towfighi, J., Zec, N., Yager, J., Housman, C., & Vannucci, R. C. (1995). Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol*, 90(4), 375-386.

Tracy, M., Downe, L., & Holberton, J. (2004). How safe is intermittent positive pressure ventilation in preterm babies ventilated from delivery to newborn intensive care unit? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 89(1), F84-87.

Trescher, W. H., Ishiwa, S., & Johnston, M. V. (1997). Brief post-hypoxic-ischemic hypothermia markedly delays neonatal brain injury. *Brain Dev*, 19(5), 326-338.

Tsai, P. T., Ohab, J. J., Kertesz, N., Groszer, M., Matter, C., Gao, J., et al. (2006). A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, 26(4), 1269-1274.

Tudehope, D. I. (2005). The epidemiology and pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Paediatr Child Health*, 41(4), 167-168.

Uehara, H., Yoshioka, H., Kawase, S., Nagai, H., Ohmae, T., Hasegawa, K., et al. (1999). A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res*, 837(1-2), 213-220.

Van den Tweel, E. R., Kavelaars, A., Lombardi, M. S., Nijboer, C. H., Groenendaal, F., van Bel, F., et al. (2006). Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Res*, 59(3), 434-439.

Van den Tweel, E. R., Peeters-Scholte, C. M., van Bel, F., Heijnen, C. J., & Groenendaal, F. (2002). Inhibition of nNOS and iNOS following hypoxia-ischaemia improves long-term outcome but does not influence the inflammatory response in the neonatal rat brain. *Dev Neurosci*, 24(5), 389-395.

Van Gelder-Hasker, M. R., van Wezel-Meijler, G., de Groot, L., van Geijn, H. P., & de Vries, J. I. (2003). Peri- and intraventricular cerebral sonography in second- and third-trimester high-risk fetuses: a comparison with neonatal ultrasound and relation to neurological development. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 22(2), 110-120.

Van Wijngaarden, P., Brereton, H. M., Coster, D. J., & Williams, K. A. (2007). Stability of housekeeping gene expression in the rat retina during exposure to cyclic hyperoxia. *Mol Vis*, 13, 1508-1515.

Vannucci, R. C., Lyons, D. T., & Vasta, F. (1988). Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke*, 19(2), 245-250.

Vannucci, R. C., & Vannucci, S. J. (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci*, 27(2-4), 81-86.

Vaucher, Y. E., Peralta-Carcelen, M., Finer, N. N., Carlo, W. A., Gantz, M. G., Walsh, M. C., et al. (2012). Neurodevelopmental Outcomes in the Early CPAP and Pulse Oximetry Trial. *New England Journal of Medicine*, 367(26), 2495-2504.

Vento, M., Moro, M., Escrig, R., Arruza, L., Villar, G., Izquierdo, I., et al. (2009). Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics*, 124(3), e439-449.

Vohr, B. R., Wright, L. L., Poole, W. K., & McDonald, S. A. (2005). Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants <32 weeks' gestation between 1993 and 1998. *Pediatrics*, 116(3), 635-643.

Volpe, J. J. (1997). Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev*, 19(8), 519-534.

Volpe, J. J. (1998a). Brain injury in the premature infant: overview of clinical aspects, neuropathology, and pathogenesis. *Semin Pediatr Neurol*, 5(3), 135-151.

Volpe, J. J. (1998b). Neurologic outcome of prematurity. *Arch Neurol*, 55(3), 297-300.

Volpe, J. J. (2001). Neurobiology of periventricular leukomalacia in the premature infant. *Pediatr Res*, 50(5), 553-562.

Volpe, J. J. (2008). *Neurology of the newborn* (5th edition). Philadelphia: Saunders/Elsevier.

Volpe, J. J. (2009). Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol*, 8(1), 110-124.

Vottier, G., Pham, H., Pansiot, J., Biran, V., Gressens, P., Charriaut-Marlangue, C., et al. (2011). Deleterious effect of hyperoxia at birth on white matter damage in the newborn rat. *Dev Neurosci*, 33(3-4), 261-269.

Wang, C. L., Anderson, C., Leone, T. A., Rich, W., Govindaswami, B., & Finer, N. N. (2008). Resuscitation of preterm neonates by using room air or 100% oxygen. *Pediatrics*, 121(6), 1083-1089.

Wang, H.-Q., Xion, Y., & Guo, W.-J. (2011). Expression of iNOS protein and gliocyte apoptosis in neonatal rats with white matter damage. *CJCP*, 13(4), 309-312.

Warner, B., Musial, M. J., Chenier, T., & Donovan, E. (2004). The effect of birth hospital type on the outcome of very low birth weight infants. *Pediatrics*, 113(1 Pt 1), 35-41.

Watterberg, K. L., Demers, L. M., Scott, S. M., & Murphy, S. (1996). Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*, 97(2), 210-215.

Weiss, J., Takizawa, B., McGee, A., Stewart, W. B., Zhang, H., Ment, L., et al. (2004). Neonatal hypoxia suppresses oligodendrocyte Nogo-A and increases axonal sprouting in a rodent model for human prematurity. *Exp Neurol*, 189(1), 141-149.

Wellmann, S., Bühner, C., & Schmitz, T. (2014). Focal necrosis and disturbed myelination in the white matter of newborn infants: a tale of too much or too little oxygen. *Front Pediatr*, 2, 143.

Wen, T. C., Rogido, M., Genetta, T., & Sola, A. (2004). Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*, 355(3), 165-168.

Werdich, X. Q., McCollum, G. W., Rajaratnam, V. S., & Penn, J. S. (2004). Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res*, 79(5), 623-630.

Whitfield, L. S., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N. (1993). Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature*, 364(6439), 713-715.

Wiswell, T. E., Graziani, L. J., Kornhauser, M. S., Stanley, C., Merton, D. A., McKee, L., et al. (1996). Effects of hypocarbia on the development of cystic periventricular leukomalacia in premature infants treated with high-frequency jet ventilation. *Pediatrics*, 98(5), 918-924.

Wood, N. S., Marlow, N., Costeloe, K., Gibson, A. T., & Wilkinson, A. R. (2000). Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. *N Engl J Med*, 343(6), 378-384.

Woodward, L. J., Anderson, P. J., Austin, N. C., Howard, K., & Inder, T. E. (2006). Neonatal MRI to predict neurodevelopmental outcomes in preterm infants. *N Engl J Med*, 355(7), 685-694.

Workman, A. D., Charvet, C. J., Clancy, B., Darlington, R. B., & Finlay, B. L. (2013). Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*, 33(17), 7368-7383.

Wu, Y. W. (2002). Systematic review of chorioamnionitis and cerebral palsy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8(1), 25-29.

Wu, Y. W., & Colford, J. M., Jr. (2000). Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *Jama*, 284(11), 1417-1424.

Wyckoff, M. H., Aziz, K., Escobedo, M. B., Kapadia, V. S., Kattwinkel, J., Perlman, J. M., et al. (2015). Part 13: Neonatal Resuscitation: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation*, 132(18 Suppl 2), S543-560.

Wyllie, J., Bruinenberg, J., Roehr, C. C., Rudiger, M., Trevisanuto, D., & Urlesberger, B. (2015). European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 7. Resuscitation and support of transition of babies at birth. *Resuscitation*, 95, 249-263.

Wyllie, J., Perlman, J. M., Kattwinkel, J., Atkins, D. L., Chameides, L., Goldsmith, J. P., et al. (2010). Part 11: Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation*, 81 Suppl 1, e260-287.

Yager, J., Towfighi, J., & Vannucci, R. C. (1993). Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res*, 34(4), 525-529.

Yang, C. S., Wang, A. G., Sung, C. S., Hsu, W. M., Lee, F. L., & Lee, S. M. (2010). Long-term visual outcomes of laser-treated threshold retinopathy of prematurity: a study of refractive status at 7 years. *Eye (Lond)*, 24(1), 14-20.

Yanowitz, T. D., Baker, R. W., Roberts, J. M., & Brozanski, B. S. (2004). Low blood pressure among very-low-birth-weight infants with fetal vessel inflammation. *J Perinatol*, 24(5), 299-304.

Yanowitz, T. D., Jordan, J. A., Gilmour, C. H., Towbin, R., Bowen, A., Roberts, J. M., et al. (2002). Hemodynamic disturbances in premature infants born after chorioamnionitis: association with cord blood cytokine concentrations. *Pediatr Res*, 51(3), 310-316.

Yokoyama, H., Ueda, Y., Itoh, O., Ikeda, T., Noor, J. I., & Ikenoue, T. (2004). EPR imaging to estimate the in vivo intracerebral reducing ability of mature rats after neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Magn Reson Imaging*, 22(9), 1305-1309.

Yoon, B. H., Romero, R., Park, J. S., Kim, C. J., Kim, S. H., Choi, J. H., et al. (2000). Fetal exposure to an intra-amniotic inflammation and the development of cerebral palsy at the age of three years. *Am J Obstet Gynecol*, 182(3), 675-681.

Yoon, B. H., Romero, R., Yang, S. H., Jun, J. K., Kim, I. O., Choi, J. H., et al. (1996). Interleukin-6 concentrations in umbilical cord plasma are elevated in neonates with white matter lesions associated with periventricular leukomalacia. *Am J Obstet Gynecol*, 174(5), 1433-1440.

York, J. R., Landers, S., Kirby, R. S., Arbogast, P. G., & Penn, J. S. (2004). Arterial oxygen fluctuation and retinopathy of prematurity in very-low-birth-weight infants. *J Perinatol*, 24(2), 82-87.

Young, R. S., Hessert, T. R., Pritchard, G. A., & Yagel, S. K. (1984). Naloxone exacerbates hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *Am J Obstet Gynecol*, 150(1), 52-56.

Young, R. S., Olenginski, T. P., Yagel, S. K., & Towfighi, J. (1983). The effect of graded hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage: a neuropathologic study in the neonatal rat. *Stroke*, 14(6), 929-934.

Yue, X., Mehmet, H., Penrice, J., Cooper, C., Cady, E., Wyatt, J. S., et al. (1997). Apoptosis and necrosis in the newborn piglet brain following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23(1), 16-25.

Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Griveau, A., Chang, S. M., Daneman, R., Fancy, S. P., et al. (2014). Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell*, 158(2), 383-396.

Zhao, P., Peng, L., Li, L., Xu, X., & Zuo, Z. (2007). Isoflurane preconditioning improves long-term neurologic outcome after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Anesthesiology*, 107(6), 963-970.

Zhao, P., & Zuo, Z. (2004). Isoflurane preconditioning induces neuroprotection that is inducible nitric oxide synthase-dependent in neonatal rats. *Anesthesiology*, 101(3), 695-703.

Zupan, V., Gonzalez, P., Lacaze-Masmonteil, T., Boithias, C., d'Allest, A. M., Dehan, M., et al. (1996). Periventricular leukomalacia: risk factors revisited. *Dev Med Child Neurol*, 38(12), 1061-1067.

Anhang

Auswertung deskriptive Statistik MBP-Score nach Gruppen

Tabelle 33: MBP-Auswertung

Tier	Ischämie + Hypoxie	Hyperoxie	Geschlecht	Reich links	Reich rechts
10A2H	ja	nein	W	4	1
10A2H	ja	nein	W	3	2
10A2H	ja	nein	W	4	2
2A2H	ja	nein	W	5	2
2A2H	ja	nein	W	5	2
2A2H	ja	nein	W	4	1
3A2H	ja	nein	M	2	1
3A2H	ja	nein	M	4	2
3A2H	ja	nein	M	4	3
3A2Ha sehr klein	ja	nein	M	6	4
3A2Ha sehr klein	ja	nein	M	6	4
3A2Ha sehr klein	ja	nein	M	6	4
4A2H	ja	nein	M	2	3
4A2H	ja	nein	M	3	2
4A2H	ja	nein	M	3	3
5A2H	ja	nein	W	6	2
5A2H	ja	nein	W	6	3
5A2H	ja	nein	W	6	2
6A2H	ja	nein	M	5	3
6A2H	ja	nein	M	4	3
6A2H	ja	nein	M	4	2
7A2H	ja	nein	W	5	3
7A2H	ja	nein	W	4	2
7A2H	ja	nein	W	5	2
8A2H	ja	nein	W	2	1
8A2H	ja	nein	W	1	1
8A2H	ja	nein	W	3	1
xA2H	ja	nein	W	6	2
xA2H	ja	nein	W	6	1
xA2H	ja	nein	W	6	0
2B2H	nein	ja	M	2	2
2B2H	nein	ja	M	2	2
2B2H	nein	ja	M	2	2
3B2H	nein	ja	M	2	3
3B2H	nein	ja	M	2	3
3B2H	nein	ja	M	2	2
4B2H	nein	ja	W	4	2
4B2H	nein	ja	W	2	1
4B2H	nein	ja	W	1	2
5B2H	nein	ja	W	2	3
5B2H	nein	ja	W	1	1
5B2H	nein	ja	W	3	2
6B2H	nein	ja	W	1	1
6B2H	nein	ja	W	2	3
6B2H	nein	ja	W	3	3

Score	AL	AR
6	9	0
5	5	0
4	8	3
3	4	7
2	3	12
1	1	7
0	0	1
gesamt	30	30

Score	BL	BR
6	0	0
5	0	0
4	1	0
3	2	5
2	9	7
1	3	3
0	0	0
gesamt	15	15

10C2H	ja	ja	M	5	3
10C2H	ja	ja	M	5	3
10C2H	ja	ja	M	5	1
2C2H	ja	ja	W	3	3
2C2H	ja	ja	W	2	0
2C2H	ja	ja	W	3	0
2C2H Infarkt	ja	ja	W	6	1
2C2H Infarkt	ja	ja	W	6	1
2C2H Infarkt	ja	ja	W	6	1
3C2H	ja	ja	W	3	2
3C2H	ja	ja	W	3	2
3C2H	ja	ja	W	4	3
4C2H	ja	ja	M	5	2
4C2H	ja	ja	M	5	2
4C2H	ja	ja	M	5	1
5C2H	ja	ja	M	6	2
5C2H	ja	ja	M	6	1
5C2H	ja	ja	M	6	3
6C2H	ja	ja	M	6	3
6C2H	ja	ja	M	6	4
6C2H	ja	ja	M	6	3
7C2H	ja	ja	W	5	2
7C2H	ja	ja	W	5	3
7C2H	ja	ja	W	5	2
9C2H	ja	ja	M	6	3
9C2H	ja	ja	M	6	3
9C2H	ja	ja	M	6	2
2D2H	nein	nein	M	0	0
2D2H	nein	nein	M	0	0
2D2H	nein	nein	M	0	0
3D2H	nein	nein	M	0	1
3D2H	nein	nein	M	0	0
3D2H	nein	nein	M	0	0
4D2H	nein	nein	W	2	1
4D2H	nein	nein	W	2	2
4D2H	nein	nein	W	2	2
5D2H	nein	nein	W	2	3
5D2H	nein	nein	W	1	2
5D2H	nein	nein	W	2	1
6D2H	nein	nein	M	2	2
6D2H	nein	nein	M	1	0
6D2H	nein	nein	M	2	2
xD2H	nein	nein	W	4	3
xD2H	nein	nein	W	2	1
xD2H	nein	nein	W	4	3
13D2H	nein	nein	W	0	0
13D2H	nein	nein	W	0	0
13D2H	nein	nein	W	0	0

Score	CL	CR
6	12	0
5	9	0
4	1	1
3	4	10
2	1	8
1	0	6
0	0	2
gesamt	27	27

Score	DL	DR
6	0	0
5	0	0
4	2	0
3	0	3
2	8	5
1	2	4
0	9	9
gesamt	21	21

Auswertung deskriptive Statistik qPCR

Tabelle 34: Auswertung deskriptive Statistik Epo-R

Seite	Gruppe	Tag	N	MW	SDS
L	A	7	8,00	5,66	0,45

L	A	11	8,00	5,75	0,34
L	A	21	8,00	6,65	0,56
L	B	7	8,00	5,56	0,84
L	B	11	8,00	5,69	0,61
L	B	21	8,00	6,57	0,74
L	C	7	8,00	5,60	0,40
L	C	11	8,00	5,22	1,03
L	C	21	8,00	6,54	0,45
L	D	7	8,00	5,94	0,51
L	D	11	8,00	5,59	0,43
L	D	21	8,00	5,70	0,83
R	A	7	8,00	6,37	0,92
R	A	11	8,00	5,56	0,43
R	A	21	8,00	5,31	1,81
R	B	7	8,00	5,59	0,86
R	B	11	8,00	5,73	0,59
R	B	21	8,00	6,62	0,99
R	C	7	8,00	5,89	0,51
R	C	11	8,00	5,41	0,52
R	C	21	8,00	6,09	0,47
R	D	7	8,00	5,48	1,36
R	D	11	8,00	5,69	0,44
R	D	21	8,00	6,39	0,62

Tabelle 35: Auswertung deskriptive Statistik HIF-1 α

Seite	Gruppe	Tag	N	MW	SDS
L	A	7	8,00	0,03	0,86
L	A	11	8,00	1,53	1,41
L	A	21	8,00	1,78	0,36
L	B	7	8,00	0,13	1,23
L	B	11	8,00	1,39	1,41
L	B	21	8,00	1,46	0,30
L	C	7	8,00	0,70	0,31
L	C	11	8,00	1,42	1,29
L	C	21	8,00	1,43	0,36
L	D	7	8,00	0,51	0,51
L	D	11	8,00	1,74	1,51
L	D	21	8,00	1,42	0,74
R	A	7	8,00	0,77	1,60
R	A	11	8,00	1,08	0,83
R	A	21	8,00	0,76	1,35
R	B	7	8,00	0,16	1,26
R	B	11	8,00	1,28	0,90
R	B	21	8,00	1,61	0,45
R	C	7	8,00	0,95	0,36
R	C	11	8,00	1,24	0,86
R	C	21	8,00	1,66	0,67
R	D	7	8,00	0,17	0,79
R	D	11	8,00	1,37	0,94
R	D	21	8,00	1,36	0,35

Tabelle 36: Auswertung deskriptive Statistik NOS-2

Seite	Gruppe	Tag	N	MW	SDS
L	A	7	8,00	7,45	1,39
L	A	11	8,00	7,67	0,66
L	A	21	8,00	8,71	0,77
L	B	7	8,00	6,81	1,73
L	B	11	8,00	7,48	0,99
L	B	21	8,00	8,11	0,92
L	C	7	8,00	7,50	0,43
L	C	11	8,00	7,10	0,57
L	C	21	8,00	8,12	0,43
L	D	7	8,00	7,50	0,97
L	D	11	8,00	7,39	0,82
L	D	21	8,00	7,98	0,90
R	A	7	8,00	7,71	1,01
R	A	11	8,00	7,44	0,41

R	A	21	8,00	7,57	1,46
R	B	7	8,00	6,78	1,67
R	B	11	8,00	7,53	0,98
R	B	21	8,00	8,31	0,80
R	C	7	8,00	7,61	0,87
R	C	11	8,00	7,34	0,74
R	C	21	8,00	7,88	0,92
R	D	7	8,00	6,97	1,10
R	D	11	8,00	7,53	0,45
R	D	21	8,00	8,51	0,62

Tabelle 37: Auswertung deskriptive Statistik TNF α

Seite	Gruppe	Tag	N	MW	SDS
L	A	7	8,00	5,12	1,60
L	A	11	8,00	5,46	1,13
L	A	21	8,00	6,24	1,24
L	B	7	8,00	6,34	1,21
L	B	11	8,00	5,57	1,12
L	B	21	8,00	6,21	0,83
L	C	7	8,00	5,74	0,48
L	C	11	8,00	5,53	1,05
L	C	21	8,00	6,04	0,64
L	D	7	8,00	6,46	0,89
L	D	11	8,00	5,21	1,24
L	D	21	8,00	5,64	0,71
R	A	7	8,00	6,77	1,12
R	A	11	8,00	5,46	0,75
R	A	21	8,00	5,69	1,42
R	B	7	8,00	6,29	1,13
R	B	11	8,00	5,93	0,45
R	B	21	8,00	6,78	0,34
R	C	7	8,00	6,66	0,57
R	C	11	8,00	5,51	0,49
R	C	21	8,00	6,08	0,56
R	D	7	8,00	6,58	1,10
R	D	11	8,00	5,65	0,52
R	D	21	8,00	6,36	0,84

Tabelle 38: Auswertung deskriptive Statistik VEGF-A164

Seite	Gruppe	Tag	N	MW	SDS
L	A	7	8,00	1,85	0,57
L	A	11	8,00	1,74	0,19
L	A	21	8,00	2,17	0,62
L	B	7	8,00	2,04	0,70
L	B	11	8,00	1,58	0,58
L	B	21	8,00	1,47	0,61
L	C	7	8,00	2,28	1,05
L	C	11	8,00	1,39	0,28
L	C	21	8,00	1,49	0,37
L	D	7	8,00	1,95	0,39
L	D	11	8,00	1,43	0,53
L	D	21	8,00	0,73	0,83
R	A	7	8,00	2,15	0,65
R	A	11	8,00	1,41	0,44
R	A	21	8,00	0,61	1,31
R	B	7	8,00	2,03	0,69
R	B	11	8,00	1,46	0,72
R	B	21	8,00	1,47	0,86
R	C	7	8,00	2,02	0,84
R	C	11	8,00	1,20	0,64
R	C	21	8,00	1,13	0,44
R	D	7	8,00	1,97	0,28
R	D	11	8,00	1,52	0,45
R	D	21	8,00	1,76	1,26

Genexpressionsanalyse - nicht-signifikante Daten

Tabelle 39: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 HIF-1 α

HIF-1 α	$\Delta\Delta CT$ mit KI	p
Hyperoxie P7 zu P11	-0,14 (-1,51-1,23)	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,31 (-2,10-1,47)	0,999
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,57 (1,93-0,79)	0,874
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,22 (-1,00-1,44)	0,999
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11	0,79 (-0,36-1,95)	0,378
Hyperoxie P7 zu P21	0,34 (-1,03-1,72)	0,993
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,53 (-2,32-1,26)	0,979
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,50 (1,86-0,85)	0,929
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,35 (0,87-1,57)	0,983
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P21	0,85 (-0,29-1,99)	0,288
Hyperoxie P11 zu P21	0,49 (-0,88-1,85)	0,944
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	-0,22 (-1,99-1,56)	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	0,07 (-1,28-1,41)	1,000
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,13 (-1,09-1,35)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P11 zu P21	0,06 (1,08-1,20)	1,000

$\Delta\Delta CT$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta CT$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Tabelle 40: Einfluss von Interventionen P7-11, P7-21 u. P11-21 NOS-2

NOS-2	$\Delta\Delta CT$ mit KI	p
Hyperoxie P7 zu P11	0,55 (-0,72-1,81)	0,860
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,99 (-2,64-0,66)	0,554
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,10 (-1,44-1,08)	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,07 (-1,05 -1,20)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P11	0,25 (-0,81-1,32)	0,994
Effekt Hyperoxie P7 zu P21	0,56 (-0,71-1,83)	0,845
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,67 (-2,33-0,98)	0,893
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,79 (-2,04-0,47)	0,499
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,02 (-1,11-1,15)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P7 zu P21	0,81 (-0,26-1,88)	0,261
Effekt Hyperoxie P11 zu P21	0,02 (-1,25-1,28)	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,32 (-1,33-1,96)	0,999
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,61 (-1,85-0,64)	0,771
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	-0,05 (-1,18-1,08)	1,000
Ischämie + Hypoxie L-R P11 zu P21	0,56 (-0,50-1,61)	0,695

$\Delta\Delta CT$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta CT$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Einfluss des Geschlechts auf MBP-Score

Tabelle 41: Fragestellung an MBP-Score mit Ergänzung des Geschlechtes

Geschlecht	Odds Ratio	p
Effekt Hyperoxie	13,72 (1,20-157,28)	0,035 *
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie	0,11 (0,01-2,34)	0,156
Ischämie + Hypoxie R	11,46 (1,41-93,22)	0,023 *
Ischämie + Hypoxie L	2158,14 (201,54-23086,42)	0,000 *
Ischämie + Hypoxie L-R	188,29 (60,34-587,57)	0,000 *
Effekt Geschlecht weiblich - männlich	0,62 (0,14-2,75)	0,533

$\Delta\Delta CT$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta CT$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Einfluss des Geschlechts auf Genexpressionsanalyse

Tabelle 42: Einfluss von Interventionen Epo-R P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit

Epo-R	$\Delta\Delta\text{CT}$	KI		p
Geschlecht W - M an P7	0,283	-0,726	1,292	0,996
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P11	-0,474	-1,943	0,996	0,988
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P21	-0,935	-2,471	0,600	0,601
Interaktion Geschlecht * Zeit P11 zu P21	-0,461	-2,036	1,114	0,994
Hyperoxie P7 zu P11	0,189	-1,018	1,396	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,297	-1,870	1,276	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,475	-1,671	0,722	0,950
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,099	-0,975	1,174	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P11	0,574	-0,437	1,585	0,691
Hyperoxie P7 zu P21	0,677	-0,526	1,880	0,701
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,136	-1,704	1,433	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,966	-2,153	0,220	0,208
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,510	-0,556	1,577	0,856
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P21	1,476	0,469	2,484	0,000*
Hyperoxie P11 zu P21	0,488	-0,717	1,693	0,943
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,161	-1,407	1,729	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,492	-1,678	0,695	0,934
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,411	-0,661	1,483	0,959
<i>Ischämie + Hypoxie L - R P11 zu P21</i>	<i>0,903</i>	<i>-0,101</i>	<i>1,907</i>	<i>0,115</i>

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Tabelle 43: Einfluss von Interventionen HIF-1 α P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit

HIF-1 α	$\Delta\Delta\text{CT}$	KI		p
Geschlecht W - M an P7	0,083	-0,877	1,043	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P11	-0,140	-1,529	1,250	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P21	-1,133	-2,586	0,319	0,257
Interaktion Geschlecht * Zeit P11 zu P21	-0,994	-2,476	0,489	0,464
Hyperoxie P7 zu P11	-0,144	-1,557	1,270	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,311	-2,153	1,531	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,571	-1,969	0,827	0,939
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,220	-1,041	1,480	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P11	0,791	-0,391	1,973	0,468
Hyperoxie P7 zu P21	0,341	-1,075	1,757	0,999
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,527	-2,371	1,317	0,995
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,503	-1,897	0,891	0,972
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,349	-0,907	1,605	0,996
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P21	0,852	-0,330	2,034	0,361
Hyperoxie P11 zu P21	0,485	-0,923	1,893	0,980
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	-0,217	-2,050	1,617	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	0,068	-1,318	1,453	1,000
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,129	-1,126	1,384	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P11 zu P21	0,062	-1,114	1,237	1,000

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Tabelle 44: Einfluss von Interventionen NOS-2 P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit

NOS-2	$\Delta\Delta\text{CT}$	KI		p
Geschlecht W - M an P7	0,107	-0,904	1,118	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P11	-0,067	-1,537	1,402	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P21	-0,968	-2,504	0,568	0,554
Interaktion Geschlecht * Zeit P11 zu P21	-0,901	-2,473	0,672	0,679
Hyperoxie P7 zu P11	0,545	-0,757	1,847	0,930
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,987	-2,687	0,712	0,661
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,180	-1,473	1,113	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,073	-1,088	1,234	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P11	0,253	-0,842	1,348	0,999
Hyperoxie P7 zu P21	0,561	-0,748	1,870	0,920
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,673	-2,378	1,033	0,951
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,788	-2,082	0,506	0,601
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,023	-1,139	1,185	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P21	0,811	-0,285	1,907	0,327
<i>Hyperoxie P11 zu P21</i>	<i>0,016</i>	<i>-1,288</i>	<i>1,320</i>	<i>1,000</i>
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,315	-1,382	2,012	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,608	-1,892	0,676	0,862
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	-0,050	-1,213	1,113	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P11 zu P21	0,558	-0,528	1,645	0,796

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Tabelle 45: Einfluss von Interventionen TNF α P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit

TNF α	$\Delta\Delta\text{CT}$	KI		p
Geschlecht W - M an P7	-0,103	-1,107	0,900	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P11	-0,286	-1,739	1,167	1,000
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P21	-0,707	-2,224	0,811	0,874
Interaktion Geschlecht * Zeit P11 zu P21	-0,420	-1,970	1,129	0,997
Hyperoxie P7 zu P11	0,705	-0,727	2,136	0,833
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,660	-2,527	1,207	0,976
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,086	-1,508	1,336	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,921	-0,356	2,198	0,363
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P11	1,007	-0,194	2,208	0,177
Hyperoxie P7 zu P21	0,864	-0,570	2,299	0,615
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,817	-2,686	1,053	0,911
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,252	-1,670	1,166	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	1,036	-0,237	2,308	0,209
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P21	1,288	0,087	2,489	0,026
Hyperoxie P11 zu P21	0,159	-1,266	1,585	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	-0,157	-2,014	1,700	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,166	-1,569	1,237	1,000
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,114	-1,156	1,385	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P11 zu P21	0,280	-0,910	1,471	0,999

$\Delta\Delta\text{CT}$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta\text{CT}$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Tabelle 46: Einfluss von Interventionen VEGF-A164 P7-11, P7-21 u. P11-21, Geschlecht und Interaktion zwischen Geschlecht und Zeit

VEGF-A164	$\Delta\Delta CT$	KI		p
Geschlecht W - M an P7	0,472	-0,632	1,577	0,921
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P11	-0,681	-2,289	0,927	0,925
Interaktion Geschlecht * Zeit P7 zu P21	-1,251	-2,932	0,429	0,319
Interaktion Geschlecht * Zeit P11 zu P21	-0,571	-2,294	1,153	0,985
Hyperoxie P7 zu P11	-0,023	-1,168	1,123	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P11	-0,303	-1,797	1,191	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P11	-0,117	-1,255	1,021	1,000
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P11	0,144	-0,879	1,166	1,000
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P11	0,261	-0,700	1,221	0,997
Hyperoxie P7 zu P21	0,237	-0,910	1,383	1,000
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P7 zu P21	-0,264	-1,759	1,230	1,000
Ischämie + Hypoxie R P7 zu P21	-0,461	-1,595	0,672	0,941
Ischämie + Hypoxie L P7 zu P21	0,404	-0,614	1,421	0,949
Ischämie + Hypoxie L - R P7 zu P21	0,865	-0,095	1,826	0,114
Hyperoxie P11 zu P21	0,259	-0,882	1,400	0,999
Interaktion Ischämie + Hypoxie * Hyperoxie P11 zu P21	0,039	-1,447	1,524	1,000
Ischämie + Hypoxie R P11 zu P21	-0,344	-1,467	0,779	0,991
Ischämie + Hypoxie L P11 zu P21	0,260	-0,757	1,277	0,998
Ischämie + Hypoxie L - R P11 zu P21	0,604	-0,348	1,556	0,543

$\Delta\Delta CT$: CT Zielgen – CT Referenzgen = ΔCT , ΔCT Intervention - ΔCT Kontrolle = $\Delta\Delta CT$

KI: Konfidenzintervall

p: p-Wert

Komplikation Infarkt

Tabelle 47: Übersicht Narkose P6

Runde	Gewicht in g	Temp. präop in Grad C	Medikation Mischung in ml	x-fache Menge Medikation im Vergleich zu Empfehlung	Zeit Injektion > einschlafen in sec	Zeit Injektion > OP-Beginn in sec	OP-Dauer in min	Antagonisierung Mischung in ml	x-fache Menge Antagonisierung im Vergleich zu Empfehlung	Temp. postop in Grad C	Menge Novalgine	Aufwachen in sec
2	11,80	33,38	0,25	2,15	147,13	400,00	19,38	0,24	2,07	34,48		99,71
3	8,88	33,22	0,14	1,50	323,23	501,18	10,92	0,14	1,50	34,60		104,60
4	8,81	31,99	0,10	1,25	1,25	1,25	10,21	0,11	1,25	31,58	0,06	160,53
5	8,78	31,28	0,13	1,49	440,87	660,00	8,86	0,13	1,49	31,51	0,10	379,89
6	8,68	33,52	0,13	1,50	355,94	489,68	10,17	0,13	1,51	33,47	0,09	107,23
	9,39	32,68	0,15	1,58	253,68	410,42	11,91	0,15	1,56	33,13	0,08	170,39

Tabelle 48: Übersicht Narkose P11

Tier	Gewicht in g	Temp. vor Untersuchung in °C	Medikation Mischung in ml	x-fache Menge Medikation im Vergleich zu Empfehlung	Zeit Injektion > einschlafen in sec	Zeit Injektion > Augen öffnen in sec	Temp. p. vor MRT in °C	MRT-Dauer in min	Temp. p. nach MRT in °C	Antagonisierung Mischung in ml	Aufwachen in min	finale Dosis in ml	x-fache Menge Medikation im Vergleich zu Empfehlung
2A2	20,6	33	0,3		30					0,3			
2A2	22,3	34,7	0,2		104	420	32	63	29	0,2			
2A2H	20,5	33,6	0,15		120	300						0,3	1,46
2B2	21	35,5	0,2		90	660	34,5	67	31,4	0,1			
2B2H	19,6	32,2	0,15	0,77	233	420					16	0,4	2,04
2C2	17,3	32,7	0,13	0,75	146	540	32,9	59	31,7	0,13	6	0,83	4,80
2C2b (Ersatz für 2C2)	17,5	34	0,13	0,74	221	600		63	29,5	0,13	4		
2C2H	19,5	33	0,15	0,77	205	600				0	4	0,3	1,54
2D2	23,3	33,5	0,15		140	480	35,1	61	31,5	0,15			

2D2H	25,8	33,8	0,2		240	480						0,35	1,36
2A2Hb	22	34,2	0,16		154	420						0,32	1,45
2A2M	20		0,6										
2B2M	21		0,6										
2C2M	19,6		0,6										
2D2M	23,4		0,6										
Mittelwert	20,89	33,65	0,29	0,76	153,00	492,00	33,63	62,60	30,62	0,14	7,50	0,42	2,11

Tier	Ge- wicht in g	Temp. vor Untersu- chung in °C	Medika- tion Mi- schung in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung	Zeit Injektion > einschla- fen in sec	Zeit Injektion > Augen öffnen in sec	Tem p. vor MRT in °C	MRT - Dau er in min	Tem p. nach MRT in °C	Antagonisie- rung Mi- schung in ml	Aufwa- chen in min	finale Do- sis in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung
3A2Ha	6,96	29,20	0,20		261	720							
3AH	17,1	32,50	0,17		185	480							
3B2H	19,76	31,10	0,19		220	240							
3C2H	15,1	32,70	0,15		378	420							
3D2H	20,38	34,00	0,2	0,98	315	360							
3A2M	16,54		0,2	1,21									
3B2M	16,2		0,2	1,23									
3C2M	15,7		0,2										
3D2M	15,1		0,2	1,32									
Mittelwert	15,87	31,90	0,19	1,19	271,80	444,00							

Tier	Ge- wicht in g	Temp. vor Untersu- chung in °C	Medika- tion Mi- schung in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung	Zeit Injektion > einschla- fen in sec	Zeit Injektion > Augen öffnen in sec	Tem p. vor MRT in °C	MRT - Dau er in min	Tem p. nach MRT in °C	Antagonisie- rung Mi- schung in ml	Aufwa- chen in min	finale Do- sis in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung
4A3H	17,30		0,17	0,98	100			63,00	29,70	0,17	2,00		
4B3H	18,00		0,18	1,00			32,50	59,00		0,18	2,00		
4C3H	13,00		0,13	1,00			30,60	53,00	32,00	0,13	12,00		
4D3M	18,66		0,18	0,96			32,70	57,00	32,50	0,18	3,00		
4A2H	17,90											0,36	2,01
4B2H	19,40											0,38	1,96
4C2H	14,00											0,30	2,14
4D2H	16,50											0,30	1,82
Mittelwert	16,85		0,17	0,99	100,00		31,93	58,00	31,40	0,17	4,75	0,34	1,98

Tier	Ge- wicht in g	Temp. vor Untersu- chung in °C	Medika- tion Mi- schung in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung	Zeit Injektion > einschla- fen in sec	Zeit Injektion > Augen öffnen in sec	Tem p. vor MRT in °C	MRT - Dau er in min	Tem p. nach MRT in °C	Antagonisie- rung Mi- schung in ml	Aufwa- chen in min	finale Do- sis in ml	x-fache Menge Medikati- on im Vergleich zu Empfeh- lung
5A2H	13,00											0,30	2,31
5B2H	12,40	32,50										0,25	2,02
5C2H	13,66											0,51	3,73
5D2H	14,60											0,60	4,11
5A3H	14,94		0,15	1,00			33,00	60,00	27,10	0,15	16,00		
5B3H	15,04		0,15	1,00			32,70	59,00	34,40	0,15	6,00		

5C3H	16,00		0,16	1,00			34,0 0	52,0 0	33,4 0	0,16	4,00		
5D3H	14,70		0,15	1,02			33,4 0	52,0 0	32,5 0	0,15	4,00		
Mittelwert	14,29	32,50	0,15	1,01			33,2 8	55,7 5	31,8 5	0,15	7,50	0,42	3,04

Tier	Gewicht in g	Temp. vor Untersuchung in °C	Medikation Mischung in ml	x-fache Menge Medikation im Vergleich zu Empfehlung	Zeit Injektion > einschla- fen in sec	Zeit Injektion > Augen öffnen in sec	Tem p. vor MRT in °C	MRT - Dauer in min	Tem p. nach MRT in °C	Antagonisierung Mischung in ml	Aufwa- chen in min	finale Dosis in ml	x-fache Menge Medikation im Vergleich zu Empfehlung
xD2H	17,27											0,68	3,94
xA2H	13,85											0,55	3,97
9C2H	13,80											0,55	3,99
8A2H	16,10											0,64	3,98
7C2H	15,77											0,62	3,93
7A2H	14,86											0,60	4,04
6D2H	15,60											0,62	3,97
6C2H	10,77											0,42	3,90
6B2H	15,73											0,62	3,94
6A2H	15,16											0,60	3,96
10C2H	13,99											0,55	3,93
10A2H	16,12											0,64	3,97
Mittelwert	14,92											0,59	3,96

Tabelle 49: MW Gewicht nach Gruppe an P11

Gruppe	Gewicht (MW)
A	16,45 g
B	18,14 g
C	15,41 g
D	18,66 g

Verzeichnis der akademischen Lehrerinnen und Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren:

in Regensburg: Bäumler, Sprenger, Wrobel,

in Witten/ Herdecke: Andler, Beine, Bertram, Bouillon, Ehrhardt, Frosch, Haage, Hatzmann, Jansen, Krummenauer, Laubert, Maier, Menger, Meyer-Rüsenberg, Roth, Scholten, Sönnichsen, Störkel, Wappler, Zirngibl.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. F. Maier danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Finanzierung und Räumlichkeiten sowie die fachliche Betreuung. Seine Unterstützung hat mich immer ermutigt in meinem Tun und er hat nicht lockergelassen, um mich für die Pädiatrie und Neonatologie zu gewinnen! Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. B. Reich (geb. Gerstner), auf deren Forschung dieses Projekt aufbaut und die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Verfügung stand. Sie ist mir ein großes Vorbild für die wissenschaftliche und klinische Tätigkeit!

Weiterhin danke ich Frau Dr. S. Kampmann für die Aufnahme in diese Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, das Projekt selbständig zu gestalten. Für die statistische Unterstützung dieses Projektes geht mein Dank an Herrn B. Greene. Außerdem gilt mein Dank den Kooperationspartnern aus der Augenklinik Gießen, Frau Prof. Dr. B. Lorenz, aber auch besonders Herrn Prof. Dr. Dr. K. Stieger und Frau Dr. J. Steck für die gute Zusammenarbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Beim Labor der Kinderklinik möchte ich mich ganz herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Diese Unterstützung hat mich motiviert zum Durchhalten. Für die praktische Durchführung und die verlässliche Mitarbeit danke ich Frau C. Rösser, Frau A. Schneider, Herrn B. Watzer und Frau Dr. A. Reningunta sowie Frau C. Vestweber für die kompetente Beratung in Fragen der Bildbearbeitung.

Besonders danke ich meiner tierärztlichen Freundin Frau Dr. J. Steck, in der ich eine motivierte, kompetente, zuverlässige und äußerst lebenswerte Kollegin und Freundin gefunden habe, um dieses Projekt umzusetzen und in schwierigen Zeiten nicht aufzugeben.

Von ganzem Herzen danken möchte ich meiner Schwester Julia sowie meinen Freundinnen und Freunden. Ihr offenes Ohr und ihre Schulter waren immer für mich da. Danke, dass sie mich immer und immer wieder bestärkt haben! Auch wenn erst in der finalen Phase dazugekommen, danke ich meinem Freund T. Werner für seinen liebevollen, geduldigen und motivierenden Beistand.

Meinen Eltern gebührt der größte Dank, denn sie glauben an mich und unterstützen mich immer. Ihre Anerkennung und Liebe gibt mir unendlich viel!